

Universidade Nova de Lisboa
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química

Desenvolvimento de linhas celulares produtoras de vectores retrovirais para terapia génica

Hélio Antunes Tomás

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Dr. Ana Sofia Coroadinha,
Unidade de Tecnologia de Células Animais,
IBET/ITQB-UNL

Monte de Caparica, 2010

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que directamente ou indirectamente contribuíram para a realização desta tese.

À Doutora Ana Coroadinha pela oportunidade de poder realizar a tese de mestrado sob a sua orientação na Unidade de Tecnologia de Células Animais, pelas palavras de encorajamento nos momentos de maior desânimo e pela preciosa e ajuda e disponibilidade.

À Doutora Paula Alves também por poder realizar a tese de mestrado na Unidade de Tecnologia de Células Animais, pelas boas condições de trabalho e pela bolsa de investigação científica.

À Professora Susana Barreiros pela sua simpatia e disponibilidade durante todo o Mestrado.

À Professora Isabel Sá-Nogueira por ter aceitado ser a orientadora interna e arguente.

À Carina Silva, à Ana Filipa Rodrigues e ao Marcos Sousa pela formação inicial

A todos os membros do TCA pela simpatia, amizade, ajuda, pelas boleias até à estação do comboio ou até casa, pelas discussões científicas e pelo bom ambiente de trabalho.

A todos os meus amigos que me permitem sorrir.

À minha namorada por todo o seu apoio, carinho, paciência e exemplo de força para nunca desistir.

Aos meus pais pelos valores que me dão e pelo esforço que têm feito para que nada me falte.

A toda a minha restante família, pelo incentivo e força para vingar na vida.

A todos o meu Obrigado.

Resumo

A terapia génica é uma tecnologia promissora para o tratamento de inúmeras doenças. Esta consiste na introdução de material genético nas células. Actualmente o método mais eficiente de transferência génica compreende a utilização de vectores virais, dos quais se destacam os vectores retrovirais que são uns dos mais utilizados em testes clínicos de terapia génica.

Os vectores retrovirais permitem a estável integração do gene terapêutico no genoma celular garantindo assim um tratamento a longo prazo. Tradicionalmente a produção de um vector retroviral com determinado gene terapêutico requer o desenvolvimento integral de uma linha celular produtora destes vectores ou o desenvolvimento de uma linha celular produtora a partir de *packaging cells lines*. Ambos os casos requerem um extenso rastreio de clones de modo a seleccionar um com uma elevada produtividade viral, sendo este um processo laborioso, demorado e imprevisível em relação às produtividades virais a se obter.

Uma estratégia recente que recorre à utilização de um sistema de recombinação de troca de *cassette*, permitiu o desenvolvimento de uma *packaging cell line* que serve de plataforma à produção de vectores retrovirais com diferentes genes terapêuticos. A produção de vectores retrovirais a partir da nova *packaging cell line* não requer a realização do rastreio referido, tendo sido eliminada a aleatoriedade inerente ao desenvolvimento de linhas celulares produtoras, o que se traduz numa redução de tempo e custos.

Este trabalho contribuiu para o desenvolvimento de *packaging cells lines* produtoras de vectores retrovirais não replicativos com diferentes tropismos. Com este intuito, foram construídos três vectores de expressão com os genes *env 4070A*, *Galv10A1* e *10A1* de modo a permitir o desenvolvimento de três linhas celulares independentes, cada uma produtora de vectores retrovirais com um determinado tropismo. Além disso, foram estabelecidas as condições de pressão selectiva e de transfecção mais adequadas a utilizar. Após transfecção e selecção foram obtidos vários clones produtores de partículas retrovirais infecciosas a partir das células transfectadas com os genes *env 4070A* e *10A1*. Para os três clones com o gene *env 4070A* que apresentaram maior título viral foi determinar a taxa específica máxima de crescimento e de produtividade viral.

Em paralelo, foi também desenvolvido um vector de expressão com um sistema de recombinação de troca de *cassette* para ser aplicado ao gene *env* de modo a estabelecer uma plataforma celular de produção de vectores retrovirais com diferentes tropismos.

Palavras-Chave: Vectores retrovirais, tropismo, sistema de recombinação de troca de *cassette*.

Abstract

Gene therapy is a promising technology for the treatment of many diseases that involves the transfer of genetic material into the patient's cells. Currently, the most efficient procedure to deliver the genetic material uses viral vectors. The retroviruses vectors are one of the most used, since they allow the stable integration of the therapeutic gene in the cell genome and consequently a long-term treatment.

Traditionally, the production of each retroviral vector with a specific therapeutic gene requires the development of a retroviral producer cell line either from the beginning or from one established packaging cell line. Both methodologies require a screening for the selection of a higher retroviral producer clone, which makes this procedure laborious and time consuming.

Recently a new strategy to develop a packaging cell line capable of producing different retroviral vectors was developed. This strategy uses recombination-mediated cassette exchange system, which finish randomness associated with development of packaging cells lines, that means a reduction of time and save money.

This work aims to contribute to the development of packaging cells lines to produce retroviral vectors with different tropisms. With this purpose, three constructs containing the *env* genes *GALV10A1*, *4070A* and *10A1* were developed, allowing the production of three independent cells lines. Each one produces retroviral vectors with a specific tropism. Moreover, the most suitable conditions for selective pressure and transfection were established. After transfection some clones were obtained, from which the three with 4070A tropism the highest viral yield were selected to determine the maximum specific growth rate and viral productivity. In parallel, an expression vector with a recombination-mediated cassette exchange system Cre/LoxP for the *env* gene was developed in order to establish a robust cellular platform for the production of retroviral vectors with distinct tropisms.

Key-words: *Packaging cells lines*, retroviral vectors, tropism, recombination-mediated cassette exchange system

Lista de abreviaturas:

AAV- *Adeno-Associated Virus*: vírus adeno-associados

ADA - *Adenosine Deaminase Deficiency*

ALV- *Avian Leukosis Virus*

bp – base pair's: pares de bases

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

FBS - *Fetal Bovine Serum*: soro fetal bovino

Ha-MuSV- *Harvey Murine Sarcoma Virus*

ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*: Comité Internacional de Taxonomía de Vírus

IRES - *Internal Ribosomal Entry Site*

LTR – *Long Terminal Repeat*

MLV - *Murine Leukemia Virus*

Mo-MLV- *Moloney Murine Leukaemia Virus*

OTC - *Ornithine Transcarbamylase*: Ornitina Transcarbamilase

PEI- polietilenamina

SCID – *Severe Combined Immunodeficiency*: Imunodeficiência Severa Combinada

SV40 – *Simian Vacuolating virus 40*

SIN – *self-inactivating vectors*

VSV-G - *vesicular stomatitis virus G protein*

Flp- enzima Flpase

FRT- *flipase recombinase target sites*

RMCE - *recombinase-mediated cassette exchange*: recombinação de troca de cassette

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Lista de abreviaturas	IV
1. Introdução	1
1.1 Origem da terapia génica	1
1.2 Doenças com potencial aplicação de terapia génica	3
1.3 O desenvolvimento da terapia génica – testes clínicos	5
1.4 Métodos de transferência génica	7
1.5 Retrovírus	10
1.5.1. Descoberta dos retrovírus e sua taxonomia	10
1.5.2 Biologia da partícula viral	10
1.5.3 Genoma viral	11
1.5.4 Ciclo de vida dos retrovírus	12
1.6 Desenvolvimento de vectores retrovirais	13
1.6.1 <i>Packaging cells lines</i>	14
1.6.2 Construção genética com o transgene (gene terapêutico)	16
1.6.2.1 Estrutura da <i>cassette</i>	16
1.6.2.2 Expressão do transgene	17
1.6.3 Tropismo dos vectores	19
1.6.4 <i>Pseudotyping</i>	20
1.6.5 Formação accidental de vectores retrovirais replicativos	21
1.7 Problemas e soluções no desenvolvimento de linhas celulares produtoras de retrovírus	22
1.7.1 Linhas celulares	22
1.7.2 Desenvolvimento de <i>packaging cells lines</i> – expressão dos elementos virais	23
1.7.3 Estequiometria dos componentes virais	24
1.8 Sistemas de recombinação de troca de <i>cassette</i>	25
1.9 Objectivos	25
1.10 Células 293#3 gp11 e 293#3 gp22	26
2. Materias e métodos	29
2.1 Material biológico	29
2.1.1 Linhas celulares	29
2.1.2 Bactérias	29
2.1.3 Plasmídeos	29
2.2 Cultura, manutenção e propagação das células animais	30

2.3 Amplificação das sequências com os genes <i>env</i> GalV10A1, 4070A e 10A1	30
2.4 Construção dos plasmídeos pMONO-zeo-GalV10A1, pMONO-zeo-4070A, pMONO-zeo-10A1 e pTagLoxP-4070A	31
2.5 Produção de plasmídeos	32
2.6 Estudos de curva-de-morte	32
2.7 Transfecções com fosfato de cálcio, PEI (polietilenamina) e subsequente pressão selectiva	32
2.8 Electroporação e subsequente pressão selectiva	33
2.9 Selecção de clones (<i>limiting dilution</i>) e rastreio das produtividades virais	33
2.10 Técnicas analíticas	34
2.10.1 Contagem das células	34
2.10.2 Titulação das partículas virais infecciosas	34
2.11 Estudos de crescimento	35
2.12 Determinação da taxa específica de crescimento e da produtividade viral	35
2.13 Análise estatística	35
3. Resultados e discussão	36
3.1 Estudos de curva de morte	36
3.2 Produção do plasmídeo pSELECT-GFPzeo-LacZ	38
3.3 Estudos de transfecção	39
3.4 Desenvolvimento das linhas celulares produtora de vectores retrovirais com diferentes tropismos	40
3.4.1 Produção dos plasmídeos pMONO-zeo-mcs, pENVA, pVPack-10A1, phGalV10A1	41
3.4.2 Amplificação das sequências com os genes <i>env</i> Galv10A1, 4070A e 10A1	41
3.4.3 Construção dos vectores de expressão pMonoZeo-Galv10A1, pMonoZeo-4070A e pMonoZeo-10A1	43
3.4.4 Titulação das partículas virais resultantes da expressão transiente dos genes <i>env</i>	43
3.4.5 Obtenção de clones e titulação das suas partículas virais infecciosas	45
3.4.6 Caracterização de clones (determinação das taxas específica máxima de crescimento e das produtividade virais)	46
3.4.7 Titulação das partículas virais resultantes da expressão transiente do novo vector de expressão pMono-Zeo-Galv10A1	48
3.4.8 Perspectivas futuras	49
3.5 Desenvolvimento da linha celular produtora de vectores retrovirais com o sistema de recombinação de troca de cassette para o gene <i>env</i>	49

3.5.1 Produção do plasmídeo pTagLoxP-mcs	49
3.5.2 Amplificação da sequência com o gene env 4070A	50
3.5.3 Construção do plasmídeo pTagLoxP-4070A	50
3.5.4 Transfecções e títulos virais	51
3.5.5 Electroporação	52
3.5.6 Perspectivas futuras	55
4. Conclusão	56
5. Referências bibliográficas	57
Anexo I	63
Anexo II	64
Anexo III	65
Anexo IV	66
Anexo V	67
Anexo VI	68
Anexo VII	69
Anexo VIII	70
Anexo IX	71
Anexo X	72
Anexo XI	73
Anexo XII	74
Anexo XIII	75

1. Introdução

A terapia génica consiste na introdução de material genético em células com o intuito de promover a cura ou abrandar a progressão de determinadas doenças ¹. Esta tecnologia é bastante promissora apresentando potencial de ser aplicada a um grande número de doenças. É vista como uma revolução em relação às terapias convencionais, principalmente devido à potencialidade de corrigir a origem das doenças e não se limitar ao tratamento dos seus sintomas ².

1.1. Origem da terapia génica

O termo “terapia génica” foi criado com o intuito de substituir e de se distanciar da má conotação atribuída de uma forma incorrecta à expressão “engenharia genética humana” que por sua vez deriva de “engenharia genética”. Esta última foi utilizada pela primeira vez no *Sixth International Congress of Genetics* em 1932 para descrever a aplicação de princípios genéticos no melhoramento de animais e plantas ³.

A terapia génica envolve um vasto conhecimento nas áreas da biologia celular e molecular pelo que o seu surgimento esteve dependente de vários avanços na ciência que ocorreram maioritariamente na segunda metade do século XX. Alguns destes avanços foram: o estabelecimento das bases de transferência de genes em bactérias, o desenvolvimento de linhas celulares e métodos de transfecção, a descoberta da tecnologia do DNA recombinante, o conhecimento da biologia viral, entre outros ³⁻⁵.

Os primeiros estudos de transferência génica em células animais utilizavam métodos não virais para introduzir o material genético no interior das células. Um destes métodos recorria à utilização de dietilamino-dextrano para facilitar a passagem de moléculas de DNA através da membrana celular. Em 1973 Graham e van der Eb desenvolveram um método de transfecção semelhante ao anterior baseado na utilização de fosfato de cálcio que apresentava melhores resultados sendo estes reprodutíveis ⁶. A base deste método é ainda hoje muito utilizada. Baseando-se neste novo método e em estudos de transfecção de células da medula óssea, alguns investigadores desenvolveram um protocolo para tentar combater a doença β -talassémia (uma doença genética que se caracteriza pela alteração do número de cadeias de hemoglobina nos glóbulos vermelhos). Esta foi a primeira tentativa clínica de terapia génica *ex-vivo*, no entanto não chegou a ser realizada devido à falta de aprovação pelo *National Institute of Health* dos Estados Unidos da América ⁴. Além dos métodos referidos, outros métodos de transfecção foram desenvolvidos e testados no decorrer do tempo, como a utilização de lipossomas e vesículas com material genético no seu interior, a formação de complexos de DNA com proteínas nucleares, a aplicação de choques eléctricos para destabilizar as membranas celulares e facilitar a entrada de DNA

para o interior das células, entre outros. O método mais promissor, apesar da sua complexidade, parecia ser a utilização de vectores virais. A utilização destes permitia obter elevadas eficiências de transfecção e é uma metodologia de fácil aplicação quer em *ex-vivo* ou *in-vivo* ⁵.

Os primeiros vectores retrovirais para estudos de terapia génica começaram a ser desenvolvidos no início da década de 1980, no entanto ainda antes do desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, no início da década de 1970, já era claro que os vírus possuíam várias características essenciais para potencial utilização em transferência génica ⁴ e em 1968 foi publicado um artigo intitulado *Use of viruses as a carriers of added genetic information*. Este artigo continha um estudo dirigido à introdução de material genético heterólogo em células utilizando como “transporte” um vírus ⁷.

Ao contrário dos métodos de transfecção que utilizam apenas moléculas de DNA complexadas com outros compostos, a transdução providenciada pelos vectores virais permite um maior controlo no número de cópias do transgene inserido no interior das células. No caso dos vectores retrovirais também permite obter de uma forma mais eficiente a estável integração do transgene no genoma celular.

O desenvolvimento dos primeiros vectores virais permitiu que a transferência génica em células animais crescesse bastante, tendo-se realizado grandes avanços na transdução de células hematopoéticas. Estes primeiros estudos utilizavam como modelo células de rato sendo os primeiros vectores virais derivados de MLV (do inglês, *Murine Leukemia Virus*) como o *Harvey Murine Sarcoma virus* (Ha-MuSV) ou o *Moloney Murine Leukaemia Virus* (Mo-MuLV) ⁸. Em 1983 e 1984 são publicados os primeiros trabalhos que descrevem a transdução estável de células hematopoéticas de rato progenitoras ⁹ e ploripotentes ¹⁰, respectivamente. Pouco tempo depois estes vectores são utilizados para testar a introdução e expressão de genes humanos com acção terapêutica como por exemplo, a introdução do gene da β -glucuronidase num modelo de rato para combater a Mucopolissacaridose do tipo VII (síndrome de Sly). Neste estudo foi demonstrado pela primeira vez a reversão de uma doença hereditária ¹¹.

O difícil acesso a células estaminais hematopoéticas e algumas dificuldades técnicas levaram os investigadores a utilizar células mais maduras ou mais diferenciadas para avançar com os estudos de transferência génica. O primeiro teste clínico de terapia génica aprovado em humanos, realizou-se nos Estados Unidos da América em 1990 com o intuito de corrigir a deficiência na enzima adenosina desaminase (ADA, do inglês *adenosine deaminase deficiency*) de duas crianças. Foram recolhidos e isolados linfócitos dos pacientes sendo posteriormente transduzidos com vectores retrovirais que transportavam material genético contendo a sequência nucleotídica da enzima adenosina desaminase e o marcador selectivo neomicina. As células resistentes à neomicina foram seleccionadas e novamente introduzidas nos pacientes. A condição física destes melhorou e foi detectado no

seu sangue, durante vários anos subsequentes, a sequência da enzima adenosina desaminase ¹². Este caso contribuiu para fortalecer a ideia que a terapia génica poderia ser uma boa solução para o tratamento de determinadas doenças e aumentar credibilidade na utilização de vectores virais.

1.2. Doenças com potencial aplicação de terapia génica

A transferência génica pode ocorrer *ex-vivo* ou *in-vivo*. No método *ex-vivo* as células do paciente são recolhidas, sofrendo posteriormente o processo de transferência génica. Após selecção e análise, as células são novamente implantadas no paciente. A metodologia *ex-vivo* permite obter uma maior eficiência de transferência génica, e a propagação das células ocorre em ambiente controlado permitindo posteriormente administrar a quantidade desejada de células modificadas ao paciente. No entanto as técnicas de propagação celular são bastantes dispendiosas e difíceis de realizar com um elevado nível de qualidade e controlo. Além disso as células possuem especificidades imunológicas características de cada paciente, o que dificulta a sua introdução noutros pacientes devido à sua imunogenicidade ².

Na alternativa *in-vivo*, a transferência génica ocorre directamente no paciente o que requer uma menor logística e menos custos ². Uma desvantagem será a infecção e transdução de outras células para além das células que se pretende transduzir, além da dificuldade de aceder a determinado órgão ou tecido. Na utilização de vectores, estes são produzidos numa linha celular independente previamente caracterizada quanto a especificidades imunológicas, podendo ser aplicados a um maior número de pacientes. No entanto poderá surgir uma resposta imunitária relacionada com a imunogenicidade e citotoxicidade do vector utilizado ^{13,14}.

Devido à falta de conhecimentos e à pouca experiência existente, a terapia génica começou por ser desenvolvida para doenças monogénicas recessivas como a fibrose cística. Estas doenças são causadas por uma mutação em ambos os alelos de um gene autossómico, ou no caso do homem no único alelo de um dos cromossomas sexuais como é o caso da distrofia muscular de Duchenne. Este tipo de mutações resulta na formação de um produto (mRNA ou proteína) não funcional, que seria necessário ao normal funcionamento do organismo.

Posteriormente começaram a ser projectados protocolos de terapia génica para doenças mais complexas como defeitos cardiovasculares e alguns tipos de cancro, ambas causadas por mutações em vários genes que podem resultar de factores ambientais, hereditários ou ambos.

O tratamento dos dois tipos de doenças referidas baseia-se geralmente na adição de informação genética (figura 1.1) com o intuito de que: o genótipo defectivo seja complementado; as células ganham uma nova função que acabe com o fenótipo maligno

(exemplo de doenças cardiovasculares); seja induzida a morte de determinadas células como por exemplo as células cancerígenas.

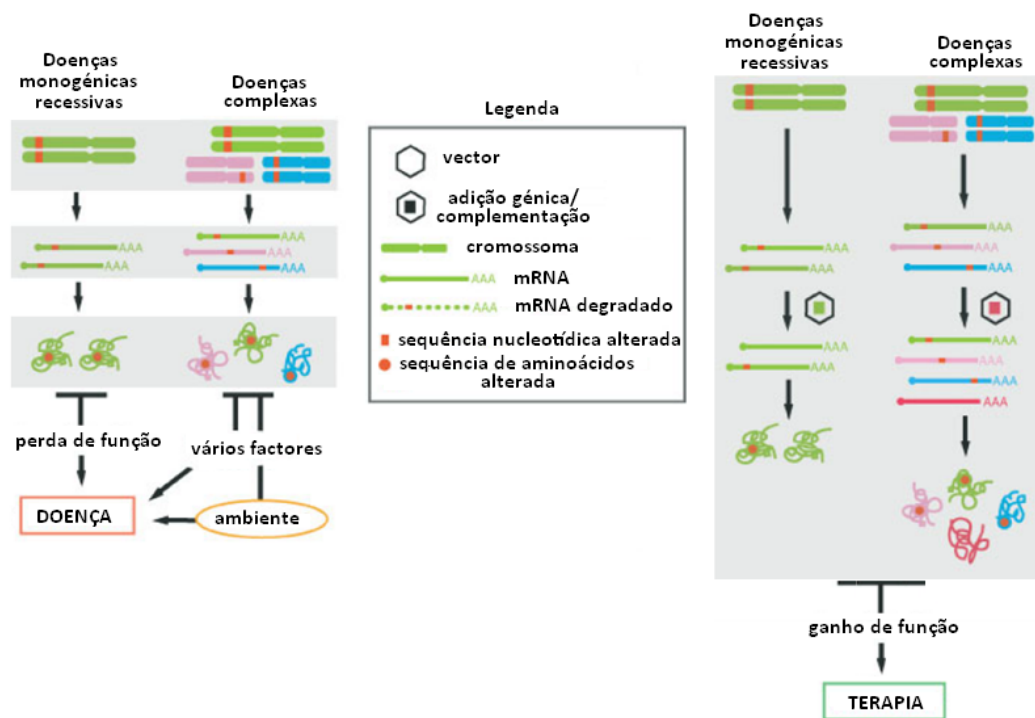


Figura 1.1: Doenças monogénicas recessivas e doenças complexas. Respectivas metodologias de terapia. Adaptado de (Gonçalves, 2005).

As doenças monogénicas dominantes como a doença de Huntington são causadas por um alelo mutado que origina um produto tóxico para o organismo. O tratamento destas doenças requer estratégias mais elaboradas que passam pela reparação da informação genética ao nível do DNA e ou do RNA através eventos de recombinação homóloga e via *exon skipping*, respectivamente. Outra alternativa será a adição de informação genética que codifique produtos que inativem ou interfiram com a acção do alelo dominante ao nível do RNA e ou das proteínas, através da utilização de RNA interferência (iRNA) (figura 1.2) ⁴.

Hoje há um grande número de doenças para as quais existe potencial de se utilizar a terapia génica como tratamento para promover a sua cura ou o abrandar sua a progressão. Entre estas encontram-se doenças tão variadas como doenças monogénicas, cardiovasculares, infecciosas, neurológicas, cancerígenas, entre outras ¹⁵.

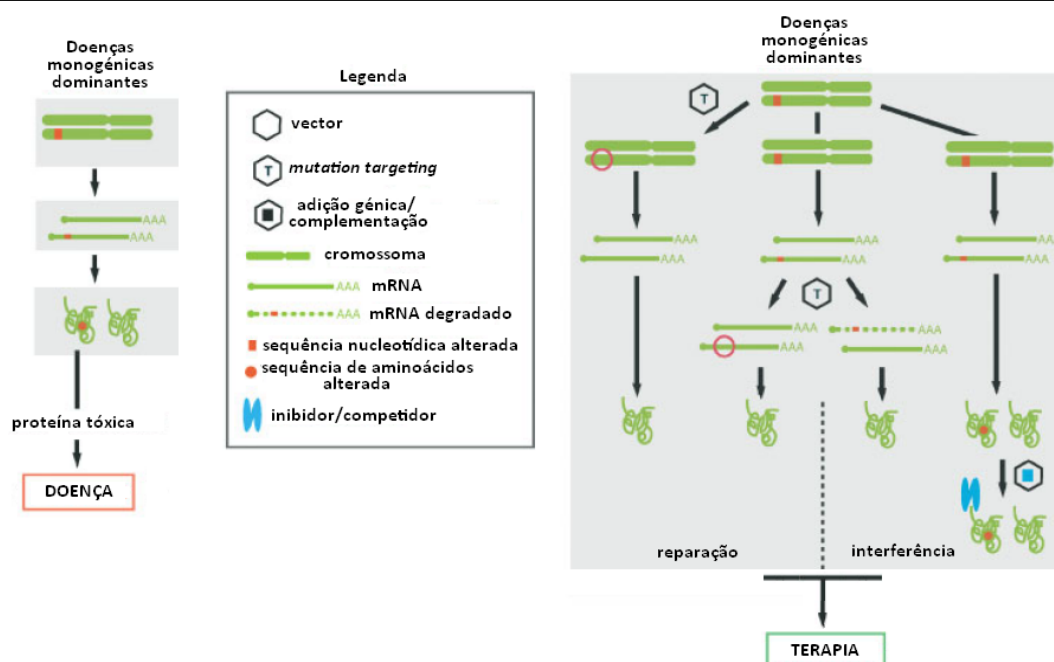


Figura 1.2: Doenças monogênicas dominantes e respectivas terapias. Adaptado de (Gonçalves, 2005).

1.3. O desenvolvimento da terapia gênica – testes clínicos

Apesar de os primeiros testes clínicos de terapia gênica terem sido aprovados no ano de 1990, esta década não foi a mais favorável para a terapia gênica. A maioria das grandes e inúmeras expectativas no início da década não foram alcançadas, e dos 167 testes clínicos realizados até ao final de 1995, poucos foram bem sucedidos¹⁶. Nessa altura começaram a aparecer artigos que reportavam este insucesso, e juntamente com as expectativas irrealistas por parte da população em geral, o investimento nesta tecnologia emergente foi bastante prejudicado. Ainda no final da década, a 17 de Setembro de 1999 ocorreu o primeiro caso de morte associado à terapia gênica, o que veio denegrir a sua imagem. Uma jovem de 18 anos que sofria de uma deficiência metabólica OTC (do inglês, *ornithine transcarbamylase*) faleceu devido a uma reacção inflamatória atribuída à elevada dose de vectores adenovirais que lhe foi administrada¹⁷.

A comunidade científica reconheceu que o desenvolvimento da terapia gênica era mais difícil do que o estipulado no início e que a primeira geração de vectores virais produzidos não contribuiu para sucesso que era esperado. Assim foram determinados quais os factores que deveriam ser melhorados no futuro desenvolvimento destes vectores. Os factores incidiam principalmente na especificidade e eficiência da transferência gênica, na especificidade e duração da expressão gênica, nas reacções imunológicas provocadas pelos vectores e na sua produção².

Em 2000 surgiram notícias animadoras vindas de França que reportavam o tratamento de crianças que sofriam de uma rara imunodeficiência ligada ao cromossoma X (SCID-X1). Esta doença caracteriza-se pela não diferenciação das células progenitoras em linfócitos do tipo T e NK (do inglês, *natural killer*). Células estaminais hematopoéticas dos pacientes

foram recolhidas e transfectadas *ex-vivo* com vectores retrovirais que transportavam sequências nucleotídicas com a potencialidade de corrigir a deficiência, sendo posteriormente introduzidas na paciente. Em 2002, duas das dez crianças tratadas desenvolveram leucemia. Posteriormente foi demonstrado que a leucemia foi causada pela integração do material genético, transportado pelo vector retroviral, perto da região promotora do proto-oncogene *LMO2*, o que induziu a sua expressão de uma forma desregulada levando ao desenvolvimento da leucemia ^{18,19}. O protocolo e condições utilizadas foram analisados e mais tarde o tratamento foi reiniciado utilizando doses mais baixas de células modificadas. Mesmo assim em 2005 uma terceira criança desenvolveu outra doença relacionada com a desregulação da expressão de um outro oncogene. É igualmente importante referir que os restantes pacientes não desenvolveram reacções adversas e beneficiaram deste tratamento ¹⁵. Com todos estes acontecimentos, os investigadores que participaram nos testes clínicos realizados em França afirmam que mesmo com o risco de leucemia, a terapia génica é ainda uma alternativa ao transplante de medula óssea para pacientes incompatíveis, e uma avaliação criteriosa da relação risco / benefício deverá ser o único critério ético subjacente à decisão de cada paciente ²⁰.

Testes clínicos semelhantes aos anteriores, ambos utilizando vectores retrovirais mas com protocolos diferentes, foram realizados no Reino Unido ²¹ e na Austrália ²² tendo sido obtidos bons resultados.

Não esquecendo os maus acontecimentos do passado e com base em todos os dados obtidos, a tecnologia da terapia génica nunca mostrou tanto potencial como hoje em dia, investindo-se cada vez mais na sua investigação para que possam ser desenvolvidos protocolos comerciáveis o mais rapidamente possível.

Os vectores virais estão cada vez mais optimizados quer em relação à especificidade quer em relação à sua segurança e os novos avanços têm contribuído para aumentar o número de doenças para as quais se poderão realizar testes clínicos de terapia génica.

Desde 2005 até à actualidade já se realizaram cerca de meio milhar de testes clínicos (Anexo I), no entanto para a maioria das doenças, estes ainda se encontra numa fase bastante preliminar do seu desenvolvimento. A maioria dos testes clínicos realizados são testes de fase I e ou II (Figura 1.3) com o objectivo de demonstrar a segurança desta nova tecnologia de transferência génica e obter informações para fases superiores como a III ou IV ².

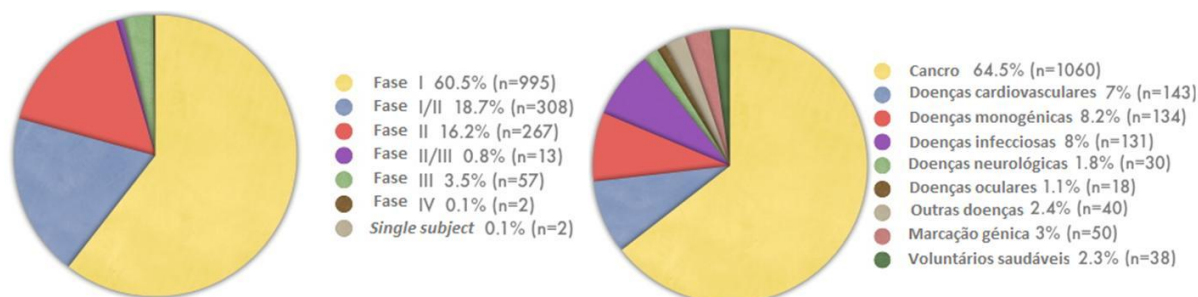


Figura 1.3: Dados relativos aos testes clínicos aprovados até ao fim do primeiro semestre de 2010. Adaptado de (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>).

Até à presente data já foram aprovados e realizados 1644 testes clínicos recorrendo à terapia génica. As doenças cancerígenas representam a maior parte de testes realizados (64,5%) principalmente devido ao elevado número de doentes existentes em comparação com as restantes categorias de doenças. De seguida aparecem as doenças cardiovasculares, doenças monogénicas e doenças infecciosas, todas representando cerca de 7-8% de todos os testes clínicos já realizados (figura 1.3). É nas doenças monogénicas que se encontra a maior taxa de sucesso de tratamento devido relativa facilidade de tratamento, comparando com outros tipos de doenças ¹⁵.

1.4. Métodos de transferência génica

Na actualidade existem vários métodos para a introdução de material genético nas células. Estes podem agrupar em três grupos: os métodos físicos, não virais e virais.

Os métodos físicos baseiam-se na utilização de *needle-free injectors* e electroporação. No caso do primeiro existem dois tipos de aparelhos que “disparam”, moléculas de DNA para o citoplasma ou espaços intersticiais das células. A electroporação foi um método muito utilizado para transfectar células *in-vitro*, sendo no entanto pouco utilizada em testes clínicos de terapia génica devido à elevada taxa de mortalidade celular provocada pelo campo eléctrico gerado. Os métodos físicos apresentam a vantagem de serem pouco imunogénicos, no entanto são pouco práticos e difíceis de adaptar a transfecções *in-vivo* ².

Os métodos não virais baseiam-se em interações químicas entre moléculas de material genético e outros compostos de modo a facilitar a passagem dos ácidos nucleicos para o interior da célula. Estes podem-se dividir em três categorias: *naked DNA*, DNA complexado com lípidos e DNA complexado com partículas iónicas. Estes métodos são os mais fáceis de produzir e os menos dispendiosos ².

A utilização de vectores virais é de uma forma geral aquela que confere uma maior eficiência de transfecção, sendo as suas maiores desvantagens os limites de tamanho de material genético a inserir nas partículas virais, o seu carácter imunogénico e a sua difícil e dispendiosa manufactura. Os primeiros vectores virais a serem desenvolvidos e utilizados em estudos de terapia génica com células animais foram vectores retrovirais, na década de 1970, mas ainda na década de 1980 começaram a ser desenvolvidos vectores com outra

origem viral como os adenovírus ou os AAV (do inglês, *adeno-associated virus*) ⁴. Actualmente existem vários tipos de vectores virais sendo os adenovírus e os retrovírus os vectores mais utilizados, respectivamente, como se pode observar na figura 1.4.

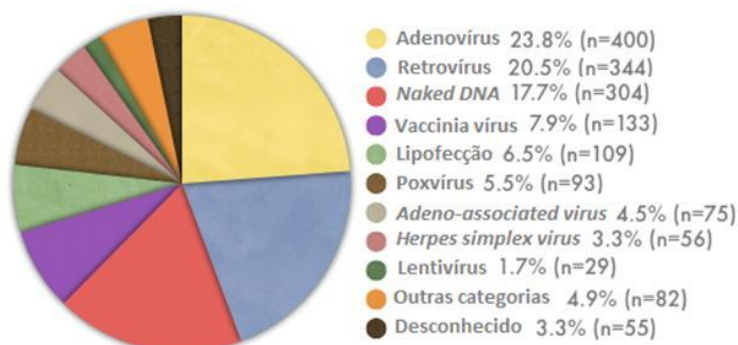


Figura 1.4: Vectores utilizados nos testes clínicos de terapia génica. Adaptado de (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>).

Na tabela 1.1 encontra-se representado um resumo das vantagens e desvantagens dos vários sistemas de transferência génica referidos.

Tabela 1.1: Vantagens e desvantagens de vários sistemas de transferência génica. Adaptado de Mountain, 2000.

Vector	Vantagens	Desvantagens
Retrovírus	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada eficiência de transdução <i>ex-vivo</i> - Expressão prolongada do gene terapêutico - Experiência clínica <i>ex-vivo</i> - Baixa imunogenicidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa eficiência de transdução <i>in-vivo</i> - Apenas consegue transduzir células que se encontrem em divisão - Possibilidade de inserção do gene terapêutico em regiões do genoma celular que sejam prejudiciais ao paciente - Produção, purificação e armazenamento muito difíceis
Lentivírus	<ul style="list-style-type: none"> - Transdução de células em divisão ou em não divisão 	<ul style="list-style-type: none"> - Limite no tamanho da sequência a ser incorporada nas cápsides virais (8 kb) - Questões de imunogenicidade relacionadas com a sua origem - Pouca experiência clínica - Produção, purificação e armazenamento muito difíceis
Adenovírus	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada eficiência de transdução - Transdução de células em divisão ou em não divisão - Experiência clínica 	<ul style="list-style-type: none"> - Limite no tamanho da sequência a ser incorporada nas cápsides virais (7,5 kb) - Pouco tempo de expressão do gene terapêutico - Elevada imunogenicidade - Produção, purificação e armazenamento difíceis
AAV	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada eficiência de transdução de vários tipos de células <i>in-vivo</i> - Expressão prolongada do gene terapêutico <i>in-vivo</i> - Baixa imunogenicidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Limite no tamanho da sequência a ser incorporada nas cápsides virais (4,5 kb) - Possibilidade de inserção do gene terapêutico em regiões do genoma celular que sejam prejudiciais ao paciente - Produção, purificação e armazenamento muito difíceis - Pouca experiência clínica - A readministração é afectada pela resposta imunitária gerada por anticorpos neutralizantes
Naked DNA	<ul style="list-style-type: none"> - Facilidade de produção, purificação e armazenamento - Baixa imunogenicidade - Seguro 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa eficiência de transfecção <i>ex-vivo</i> e <i>in-vivo</i> - Tempo de expressão do gene terapêutico reduzido - Dificuldade de realizar mais do que uma transfecção
Lípidos catiónicos	<ul style="list-style-type: none"> - Transfecção <i>ex-vivo</i> eficiente - Facilidade de produção de produção, purificação e armazenamento - Baixa imunogenicidade - Seguro 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa eficiência de transfecção <i>ex-vivo</i> e <i>in-vivo</i> - Tempo de expressão do gene terapêutico reduzido - Dificuldade de realizar mais do que uma transfecção
DNA complexo com outras moléculas	<ul style="list-style-type: none"> - Transfecção <i>ex-vivo</i> eficiente - Produção, purificação e armazenamento relativamente fáceis e com poucos custos - Muito pouco imunogénico - Seguro - Possível realização de mais do que uma transfecção 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa eficiência de transfecção <i>in-vivo</i> - Pouco tempo de expressão do gene terapêutico - Pouca experiência clínica

1.5. Retrovírus

1.5.1. Descoberta dos retrovírus e sua taxonomia

Os retrovírus foram descobertos no início do século XX no decorrer de investigações em galinhas sobre doenças neoplásicas. Em 1908 o grupo liderado por Vilhelm Ellermann e Oluf Bang demonstram que a formação de leucoses em galinhas é causada por um vírus. Estes vírus actualmente pertencem a um grupo de vírus conhecidos como ALV (do inglês, *Avian Leukosis Virus*). Desde então até à actualidade foram descobertos vários géneros de retrovírus.

Os genes utilizados neste trabalho pertencem à estirpe Mo-MLV (do inglês, *Moloney Murine Leukemia vírus*). Esta estirpe é caracterizada por infectar ratos e foi descoberta em 1960 tendo sido baptizada com o nome do seu descobridor, J. B. Moloney²³. Foi ainda através de estudos com retrovírus, e posteriormente com a descoberta da enzima transcriptase reversa, que se verificou que o dogma central da biologia estava errado, verificando-se que estes vírus possuem genoma de RNA e que este pode ser reversamente transcrito em DNA⁴.

Os Retrovírus compreendem uma vasta e diversa família de vírus de RNA com um invólucro lipídico, possuindo semelhanças ao nível da estrutura, organização genómica e propriedades replicativas²⁴. No passado, eram agrupados principalmente com base na sua morfologia²⁵ existindo três grupos maioritários designados de B, C e D. Actualmente, a taxonomia recomendada pelo ICTV (do inglês, *International Comitee on Taxonomy of Viruses*) divide a família *Retroviridae* em sete géneros como se observa na tabela 1.2.

Tabela 1.2: Taxonomia dos vírus pertencentes à família *Retroviridae*. Adaptado de (<http://ictvonline.org/index.asp>).

Ordem	Família	Sub-família	Género	Morfologia
Não atribuído	<i>Retroviridae</i>	<i>Orthoretrovirinae</i>	<i>Alpharetrovirus</i>	C
			<i>Betaretrovirus</i>	B e D
			<i>Deltaretrovirus</i>	
			<i>Epsilonretrovirus</i>	
			<i>Gammaretrovirus</i>	C
		<i>Spumaretrovirinae</i>	<i>Lentivirus</i>	
			<i>Spumavirus</i>	

Uma das principais características da família *Retroviridae* é a sua estratégia replicativa que inclui a transcrição reversa do RNA viral em dupla cadeia de DNA e posterior integração do provírus no genoma celular²⁶.

1.5.2. Biologia da partícula viral

Os retrovírus possuem cerca de 120 nm de diâmetro²⁷ e são constituídos por uma dupla camada lipídica que se encontra a envolver uma cápside proteica que contém no seu interior o genoma viral. O seu genoma é constituído por duas cadeias lineares de RNA de

polaridade positiva com um tamanho entre os 7 e 11 kb. As cadeias de RNA, proteínas necessárias à replicação viral (transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e protease (PR)) entre outras proteínas formam a nucleocápside (NC). Esta por sua vez encontra-se no interior de uma cápside proteica (CA). A interligar a cápside e a dupla camada lipídica existem as proteínas da matriz (MA) ²⁶.

A dupla camada lipídica das partículas virais tem origem na membrana celular das células hospedeiras e possui na sua constituição glicoproteínas virais específicas que irão permitir a entrada da partícula viral na célula hospedeira. Estas glicoproteínas são constituídas pelas subunidades transmembranar (TM) e de superfície (SU) que se encontram interligadas por uma ligação dissulfureto. A subunidade SU irá interagir com os receptores das células permitindo assim que a subunidade TM sofra alterações conformacionais que irão promover a fusão da membrana viral com a membrana celular ²⁸⁻³⁰.

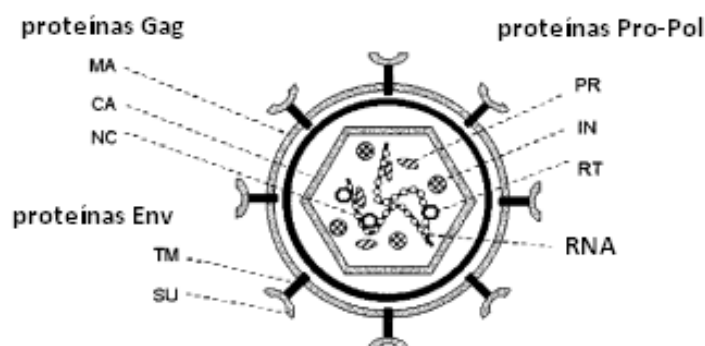


Figura 1.5: Estrutura de um retrovírus. Adaptado de Palù *et al.* 2000.

1.5.3. Genoma viral

Os retrovírus, consoante o seu genoma viral, podem ser classificados em retrovírus simples ou retrovírus complexos. A diferença entre ambos consiste na complexidade do seu genoma. Os retrovírus complexos ao invés dos retrovírus simples, possuem genes acessórios que conferem funções adicionais na regulação da expressão dos seus genes, na montagem das partículas virais e na replicação viral ²⁷.

Todos os retrovírus possuem quatro famílias de genes em comum: *gag*, *pro*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica as três principais proteínas estruturais MA, CA, NC e a proteína p12 que participa na montagem dos vírus. O gene *pro* situado entre o gene *gag* e *pol* codifica as proteases responsáveis pela clivagem dos transcritos Gag e Gag-Pol e pela maturação das partículas virais. A sequência *pol* codifica as enzimas RT e IN. A primeira é responsável pela transcrição reversa do RNA viral em dupla cadeia de DNA (Anexo II), sendo esta estrutura agora designada de provírus. A IN é responsável pela integração do DNA proviral no genoma celular. Por fim, o gene *env* codifica as duas subunidades (SU e TM) das glicoproteínas que em conjunto com a bicamada lipídica formam a estrutura designada de invólucro viral ou *envelope*.

Nas extremidades do genoma encontram-se regiões *cis-acting* que contêm elementos que regulam a expressão dos genes, a transcrição reversa e a integração do provírus no

genoma celular. Na fase inicial da transcrição reversa as regiões U5 e U3 (do inglês, *untranslated region*) são duplicadas originando os LTR's (do inglês, *long terminal repeats*) do genoma proviral que apresentam a estrutura U3-R-U5 (Anexo II). A região R das extremidades do genoma viral possui uma sequência idêntica para ambas, o que irá fornecer a homologia necessária para a continuação da transcrição reversa após o início da formação da primeira cadeia simples de DNA. A região U3 possui o promotor e o *enhancer* que irão regular a expressão dos genes. A região U5 encontra-se uma sequência designada de PBS (do inglês, *primer binding site*) complementar ao tRNA celular utilizado como *primer* no início da transcrição reversa. Por sua vez, a jusante desta, está a sequência psi (Ψ) que irá permitir a incorporação do RNA viral nas novas partículas virais formadas. A montante da região U3 do genoma viral encontra-se a região PPT (do inglês, *polypurine tract*) onde se inicia a síntese da cadeia positiva de DNA durante a transcrição reversa ²⁷.

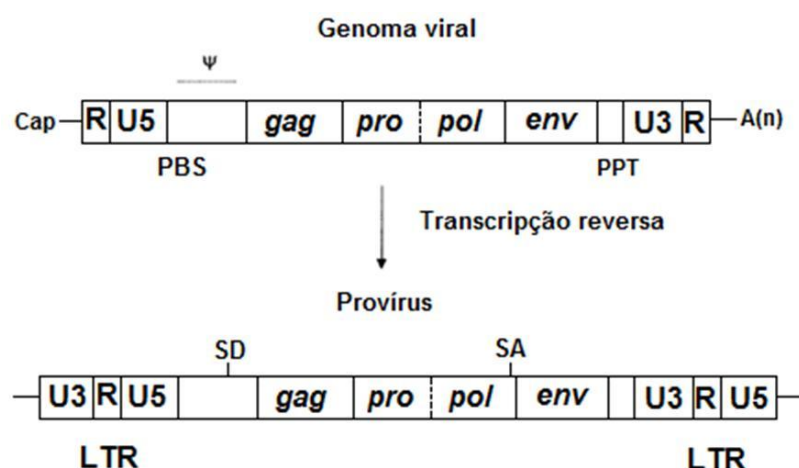


Figura 1.6: Estrutura do genoma de um retrovírus simples e do respectivo provírus. Adaptado de Palù *et al*, 2000.

No caso dos retrovírus simples, existem dois locais de *splicing* no genoma viral. O SD (do inglês, *splice donor*) localizado imediatamente a montante do PBS e o SA (do inglês, *splice acceptor*) que se encontra na região 3' do gene *pol*. Estes locais são necessários à formação do mRNA que irá originar as glicoproteínas Env ³¹.

1.5.4. Ciclo de vida dos retrovírus

O ciclo de vida dos retrovírus inicia-se com a infecção. Este processo resulta da interacção entre as glicoproteínas codificadas pelo gene *env*, situadas à superfície da partícula viral, e os receptores da membrana celular da célula hospedeira. Esta interacção irá promover a fusão de ambas as membranas lipídicas e permitir a entrada da cápside viral no interior das células. Após a entrada da cápside, esta é parcialmente degradada e é iniciado o processo de transcrição reversa originando o complexo de pré-integração. Este último consiste num complexo de proteínas virais e celulares com o genoma viral já na forma de dupla cadeia de DNA.

O complexo de pré-integração é transportado até junto da membrana nuclear precedendo o próximo passo que será a entrada no núcleo e integração permanente do agora designado provírus no genoma celular, através da acção da enzima integrase²⁷. No caso dos retrovírus complexos, como o HIV, o complexo de pré-integração entra no núcleo passando através dos poros da membrana nuclear. Ao contrário destes, o complexo de pré-integração dos retrovírus simples como os MLV não passa através dos poros nucleares, estando dependente da desintegração da membrana nuclear aquando a ocorrência de mitose³²⁻³⁴.

Após a integração no genoma celular, o provírus é transcrito em mRNA através da DNAPolimerase celular. Este mRNA pode ir directamente para o citoplasma onde será a unidade de tradução das proteínas Gag, Pro e Pol ou então ser incorporado nas novas partículas virais. No núcleo, o mRNA pode ainda sofrer um evento de *splicing*, no caso dos retrovírus simples, sendo posteriormente traduzido nos ribossomas do retículo endoplasmático, sendo a proteína resultante glicosilada no complexo de Golgi originando assim as glicoproteínas Env. Nos retrovírus complexos ocorrem vários eventos de *splicing* que originarão os mRNA's das várias proteínas acessórias.

A montagem das partículas virais e a incorporação do genoma viral no interior destas, ocorre em regiões específicas junto à membrana celular. As novas partículas virais formadas saem para o meio extracelular através de um processo designado de *budding* e é já fora das células que ocorre a sua maturação através da acção das proteases virais.

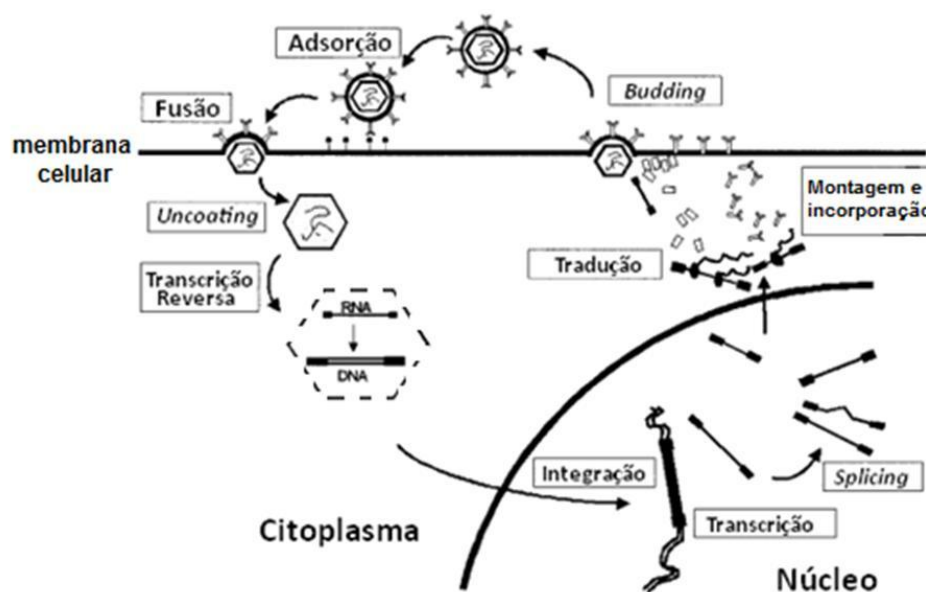


Figura 1.7: Ciclo de vida dos retrovírus. Adaptado de Palù *et al*, 2000.

1.6. Desenvolvimento de vectores retrovirais

Os retrovírus são potencialmente patogénicos e a sua utilização clínica implica o desenvolvimento de vectores retrovirais que transportem os genes terapêuticos, mas que sejam incapazes de transferir as suas funções virais ou de se replicar, sendo assim o menos imunogénicos e citotóxicos possível²⁷. No entanto em algumas terapias como a viroterapia oncolítica, tenta-se tirar partido de várias características virais como a sua replicação, para

desenhar vectores com o objectivo de matar determinadas células, como por exemplo células tumorais ³⁵.

Neste trabalho pretende-se desenvolver linhas celulares para a produção de vectores retrovirais sem capacidade replicativa.

Na natureza existem vectores retrovirais recombinantes que transferem genes não virais para as células. Alguns destes vírus terão adquirido genes celulares (oncogenes) após a inserção do provírus perto destes, o que poderá ter levado à sua incorporação nas partículas virais formadas após a transcrição conjunta do genoma viral e dos oncogenes. Estes vírus contêm todos os elementos necessários para a transcrição reversa e integração do provírus no genoma celular, mas são defectivos para parte das suas sequências codificantes estruturais. Assim, apenas se conseguem replicar na presença de outros vírus replicativamente competentes. Foi baseado nestes vírus sem capacidade replicativa que foram desenvolvidos os primeiros vectores retrovirais ²⁷.

Os vectores retrovirais simples, designados daqui para a frente de vectores retrovirais, podem ser produzidos através de co-transfecção transiente de plasmídeos com os genes estruturais e a sequência a ser inserida no interior das partículas virais formadas, ou através de linhas celulares estáveis (*packaging cells lines*) em que a sequência com o transgene pode ser inserida de uma forma transiente ou estável, nas mesmas ³⁶.

1.6.1. *Packaging cells lines*

São designadas de *packaging cells lines* as linhas celulares a partir das quais é possível a produção de vectores retrovirais após a expressão do transgene nas mesmas. A formação destas linhas celulares resulta da inserção de vectores de expressão (geralmente sobre a forma de plasmídeos) com os genes virais *gag*, *pro*, *pol* e *env*, no genoma celular.

Os genes *gag*, *pro*, *pol* e *env* são inseridos num plasmídeo diferente do de onde se encontra o transgene (gene terapêutico). A construção genética com o transgene, depois de transcrita, irá ser a única a ser incorporada nas partículas virais formadas. Assim os vectores retrovirais produzidos não serão replicativamente competentes (Anexo III).

Ao longo do tempo, foram desenvolvidas várias *packaging cells lines* para a produção de vectores retrovirais. A primeira geração de *packaging cells lines* contém um genoma retroviral ao qual foi removida a sequência de “empacotamento” (Ψ). Esta *cassette* genética tem como função a produção das proteínas Gag, Pol, Pro e Env. Para a produção de vectores retrovirais é introduzida nestas células uma segunda *cassette* genética contendo um genoma retroviral onde as regiões codificantes das proteínas referidas foram substituídas pelo gene terapêutico. É esta última *cassette* que irá ser incorporada nas partículas virais formadas ³⁷. Nas linhas celulares produtoras de vectores retrovirais, apesar da distribuição dos elementos virais pelas duas construções genéticas e da remoção da sequência Ψ de uma delas, a produção de vectores com capacidade replicativa é

relativamente fácil de ocorrer através de um evento de recombinação homóloga entre as construções³⁸, como se observa na figura 1.8.

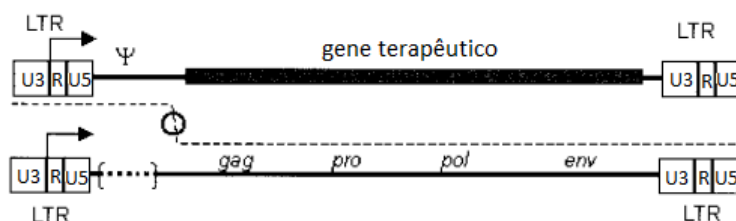


Figura 1.8: Construções genéticas que compõem a primeira geração de *packaging cell lines*. Adaptado de Palù *et al*, 2000.

A segunda geração de *packaging cells lines* difere da primeira devido a alterações adicionais na construção genética com os genes que codificam as proteínas estruturais. Um exemplo deste tipo de *packaging cells lines* é a linha celular PA317, ainda utilizada para a produção de vectores³⁹. Nesta linha celular, o LTR da extremidade 3' e o PPT, da construção genética referida anteriormente, foram substituídos pela sequência de poliadenilação (pA) do vírus SV40. Assim, nas linhas celulares produtoras de vectores retrovirais serão necessários dois eventos de recombinação homóloga que para sejam produzidos vectores replicativos²⁷ como se observa na figura 1.9.

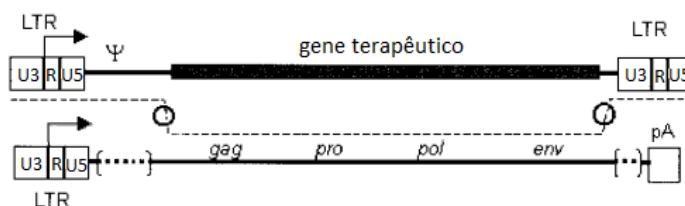


Figura 1.9: Construções genéticas que compõem a segunda geração de *packaging cell lines*. Adaptado de Palù *et al*, 2000.

A terceira geração de *packaging cells lines* é caracterizada por possuir duas *cassettes* de expressão independentes com os genes estruturais. Uma possui os genes *gag*, *pro* e *pol* e a outra o gene *env*. Desta maneira, nas células produtoras de vectores retrovirais são necessários três eventos de recombinação homóloga entre as três para gerar vectores com capacidade replicativa²⁷, como se pode observar na figura 1.10. No entanto mesmo com esta “arquitetura”, a produção de vectores virais replicativos já foi reportada⁴⁰.

De modo a reduzir as sequências homólogas entre as construções genéticas, podem realizar-se ainda outras alterações, como a utilização de LTR's de espécies de vírus diferentes ou a sua parcial ou completa substituição por promotores (P) e outras sequências heterólogas²⁷ (figura 1.10).

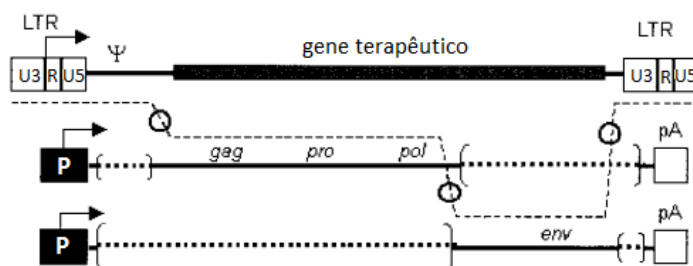


Figura 1.10: Construções genéticas que compõem a terceira geração de *packaging cell lines*. Adaptado de Palù *et al*, 2000.

Esta última geração de linhas celulares produtoras de retrovírus é de facto a mais segura, já tendo sido adoptada para construção da linha celular a 293 FLEX³⁹.

1.6.2. Construção genética com o transgene (gene terapêutico)

A construção genética onde se encontra o transgene, além de ter que ser incorporada nas cápsides produzidas, tem que ter a capacidade de ser reversamente transcrita e integrada no genoma celular das células transduzidas com os vectores retrovirais. Para permitir estas funções a construção tem que possuir determinadas sequências *cis-acting* pertencentes ao genoma viral²⁷.

1.6.2.1. Estrutura da *cassette*

Como já referido, por razões de segurança, é conveniente que a construção genética com o transgene possua o mínimo de sequências virais, apenas as estritamente necessárias para assegurar as funções anteriormente mencionadas. Essas sequências são o RSL (do inglês, *R-region stem loop*), o sinal Ψ , o PBS, o PPT e partes dos LTR que são essenciais para os processos de transcrição reversa e integração no genoma viral (as regiões R, U5 e pequenas sequências denominadas de sequências *attachment* localizadas no início e fim da das regiões U3 e U5, respectivamente).

Como se pode observar na figura 1.11, determinadas sequências presentes na construção genética formam estruturas secundárias após a sua transcrição. Estas estruturas irão desempenhar determinadas funções como é o caso dos *stem-loop* formados nas pelas regiões RSL e PBS que irão conferir estabilidade ao mRNA e assim aumentar a quantidades deste no citoplasma³⁶.

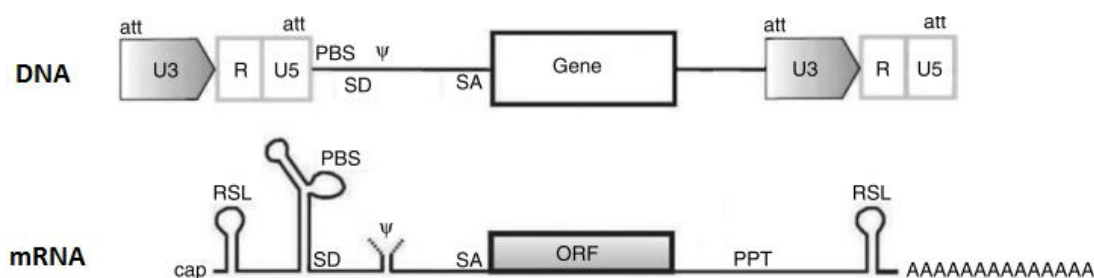


Figura 1.11: Esquema de uma *cassette* com o gene terapêutico e respectivo mRNA após a transcrição. ORF-(do inglês, *open reading frame*). Adaptado de Schambach *et al*, 2007.

Para aumentar a segurança dos vectores, foram também desenvolvidos os *self-inactivating vectors* (vectores SIN)⁴¹. Nestes, a estrutura da construção genética com o transgene é um pouco diferente da referida anteriormente. As sequências que se situam na região U3 dos LTR's e que regulam a expressão de toda a construção génica, são

removidas originando uma região $\Delta U3$. Assim terão que se adicionar sequências heterólogas para promoverem a transcrição da *cassette*, como se observa na figura 1.12.

Aquando a transcrição reversa (Anexo II) (após a infecção das células com as partículas virais produzidas) será originado um pseudo-provírus com o LTR 5' defectivo, incapaz de promover a transcrição do gene terapêutico após a integração deste no genoma celular. Assim torna-se necessário a inserção de um promotor interno a montante do transgene, para que este possa ser expresso. Como consequência desta estrutura, nas *packaging cells lines* resultantes, são produzidos dois mRNA's com o transgene. No entanto só um possui a sequência Ψ que lhe irá permitir ser incorporado nas partículas virais formadas (figura 1.12)

36

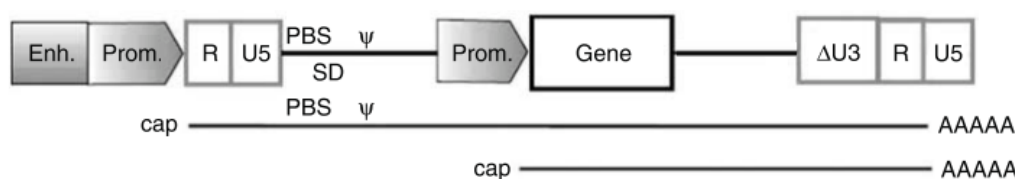


Figura 1.12: Esquema de uma *cassette* com o gene terapêutico e respectivos mRNA após a transcrição, pertencentes a um vetor SIN. Adaptado de Schambach *et al*, 2007.

Os vectores SIN possuem algumas vantagens quando comparados com os vectores cujo a expressão é promovida pela região reguladora presente no LTR (*LTR-driven retroviral vectors*): a probabilidade de produção de vectores replicativamente competentes após um evento de recombinação é menor; o risco de desregulação da expressão de genes celulares induzida pela forte região reguladora presente no LTR, após a inserção do vector no genoma celular ⁴² é minimizado; a ausência da forte região reguladora também irá evitar interferências com outros sistemas de expressão do transgene; se as células estiverem a expressar um transgene proveniente de um vector SIN, caso sejam infectadas por um vírus com capacidade replicativa, é pouco provável que as novas partículas virais formadas incorporem o mRNA do transgene uma vez que este não possui o sinal Ψ que permite a sua incorporação nas partículas virais.

Apesar de todas estas vantagens o “desenho” da estrutura e produção destes vectores é complicado, exigindo mais pré-requisitos no que diz respeito ao desenvolvimento da construção génica com o transgene. Geralmente os títulos virais dos vectores SIN também são mais baixos que os dos vectores que preservam a região reguladora do LTR. No entanto, actualmente já existem várias estratégias ou alternativas para tentar resolver os problemas que possam surgir durante o desenvolvimento dos vectores SIN ³⁶.

1.6.2.2. Expressão do transgene

A sequência nucleotídica transportada pela maioria dos vectores retrovirais utilizados apenas possui um transgene a ser expresso nas células. Neste caso, a transcrição do

transgene pode ser promovida pela própria região promotora existente no LTR (pois esta é activo em vários tecidos) ou alternativamente por um promotor heterólogo como no caso dos vectores SIN.

Caso a expressão do transgene seja regulada por um promotor heterólogo situado imediatamente a montante do gene, e a região promotora do LTR (ou outra em substituição desta) continuar presente, a expressão do transgene pode ser comprometida pela interferência do promotor da região LTR sobre o promotor heterólogo^{43,44}.

Para a expressão de mais que um transgene na mesma construção génica (co-expressão), existem várias alternativas possíveis a seguir:

- Promotor heterólogo: entre os transgenes pode ser inserido um promotor heterólogo criando duas unidades de transcrição independentes (figura 1.13). No entanto poderão surgir algumas interferências entre os promotores, como já referido.



Figura 1.13: Construção genética com dois transgenes genes terapêutico e respectivas unidades de tradução. Adaptado de Palù *et al*, 2000.

A utilização de promotores heterólogos específicos poderá permitir que o transgene apenas seja expresso em determinados tipos de células e assim contribuir para a especificidade da acção terapêutica do vector retroviral⁴⁵.

- *Splicing*: assim como para os genes estruturais dos retrovírus, os dois transgenes podem pertencer à mesma unidade de transcrição, estando um deles flanqueado por regiões reconhecidas por endonucleases. Ao realizar-se o *splicing* após a transcrição, serão originados duas unidades de tradução independentes como se observa na figura 1.14. No entanto, o evento de *splicing* é difícil de controlar não podendo ser inativado, o que irá baixar a eficiência de transdução dos títulos virais produzidos³⁶.



Figura 1.14: Construção genética dois transgenes e respectivas unidades de tradução. Adaptado de Palù *et al*, 2000.

- Proteínas de fusão: os transgenes podem se encontrar na mesma unidade de transcrição e na mesma grelha de tradução originando assim um polipéptido que resulta da fusão entre cada proteína codificada por um transgene. Apesar de ser uma alternativa simples, através da fusão das proteínas poderão resultar alterações conformacionais que poderão afectar as suas funções^{46,47}.

- IRES (do inglês, *Internal Ribosomal Entry Site*): para evitar interferências que podem ocorrer entre promotores heterólogos, pode inserir-se entres os genes uma sequência IRES (figura 1.15). Neste caso, a transcrição dos genes ocorre normalmente, formando-se um único mRNA com duas unidades de tradução. Uma a partir da extremidade 5' e outra a partir da sequência IRES. A sequência IRES, após transcrita, forma uma estrutura secundária que irá promover a tradução a partir desta. Apesar de não existirem interferências entre promotores durante a transcrição, geralmente observa-se uma maior tradução do gene regulado pela sequência IRES, não sendo esta a melhor alternativa a utilizar caso seja requerido a mesma quantidade de expressão de ambas as proteínas ^{27,36}.

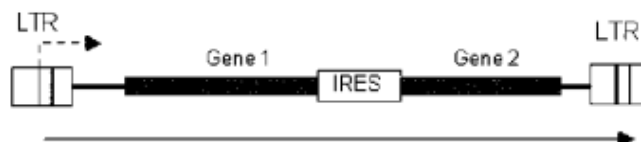


Figura 1.15: Construção genética com dois transgenes separados por uma sequência IRES, e respectivo mRNA. Adaptado de Palù et al. 2000.

- *2A self-cleavage sites* ⁴⁸: Neste caso, ambas as proteínas são produzidas como proteínas de fusão, estando separadas por um péptido específico. Este é constituído por aproximadamente 20 aminoácidos e o seu C-terminal possui a sequência *prolyl-glycyl-prolyl* (PG|P) que será clivada pelo mecanismo de *skipping* do ribossoma. A clivagem originará assim duas proteínas independentes. Esta estratégia permite a uma expressão idêntica para ambas as proteínas e poderá ser aplicada mais que uma vez na mesma construção genética ³⁶.

-Promotores bidireccionais: esta metodologia foi utilizada por Amendola *et al*, (2005) e consiste na utilização de dois promotores orientados de uma forma *antisense* partilhando o mesmo *enhancer*, permitindo a transcrição de dois genes em direcções opostas. No entanto estas construções geralmente não permitem a obtenção de títulos virais elevados ³⁶.

1.6.3. Tropismo dos vectores

De um modo geral, o tropismo dos vírus depende da especificidade da interacção entre as proteínas que se encontram à superfície da partícula viral e os receptores que se encontram à superfície das células hospedeiras. No caso dos MLV, existem diferentes genes *env* que codificam para várias glicoproteínas que por sua vez interagem com diferentes receptores à superfície das células. Como exemplo, a glicoproteína 4070A interage com o receptor Ram1 e a glicoproteína 10A1 pode interagir com o receptor Ram1 e Glvr1 ⁴⁹.

1.6.4. *Pseudotyping*

Um aspecto importante tanto para a segurança como para a eficiência da transferência génica utilizando vectores virais é a especificidade de infecção. Se um vector for modificado de modo a infectar apenas determinadas células, a eficiência de transdução será otimizada e as células que não precisam de tratamento não serão transduzidas, minimizando assim o risco de surgimento de efeitos indesejados.

No caso dos retrovírus, é possível a integração de proteínas heterólogas não específicas nos seus invólucros lipídicos²⁷. Este processo é designado de *pseudotyping*.

Na última geração de *packaging cells lines*, o facto de se inserir o gene *env* numa construção independente, permite a fácil produção de vectores com diferentes glicoproteínas Env. Podem ser produzidos vectores com glicoproteínas Env de diferentes espécies ou diferentes famílias de retrovírus como é o caso dos vectores produzidos pela linha celular 293 FLEX que produz vectores cujas proteínas Env pertencem ao Gibbon Ape Leukemia vírus³⁹. Por exemplo, foi descoberto que os mesmos vectores retrovirais derivados de MLV são mais resistentes ao soro humano com as glicoproteínas Env derivadas de retrovírus endógeno de felídeos RD114 do que com as derivadas de do MLV 4070A. Também já foram produzidos vectores retrovirais com a subunidade SU da VSV-G (do inglês, *vesicular stomatitis virus G protein*) que além de permitir a eficiente infecção de vários tipos de células, possui a vantagem da sua estrutura monomérica resistir à ultra-centrifugação durante o processo de purificação. No entanto esta proteína é citotóxica para muitas células o que dificulta a sua expressão constitutiva nas *packaging cells*^{50,51}. Um outro exemplo é o caso de vectores retrovirais com as proteínas Env do HIV-1 (do inglês, Human Immunodeficiency Virus – Type 1) que infectam especificamente as células CD4 positivas⁵², confirmando assim a importância do estudo e selecção destas proteínas para o desenvolvimento de terapias mais específicas e consequentemente mais seguras.

Além da utilização de proteínas Env de outros vírus, estas proteínas podem também ser modificadas geneticamente ou quimicamente, tendo como objectivo aumentar a eficiência e ou a especificidade da infecção. Ao N-terminal de glicoproteínas truncadas podem ser adicionados polipéptidos ou então substituir parte da sequência nucleotídica SU por sequências de partes de outras proteínas como a eritropoétina ou partes de anti-corpos, de modo a permitir a interacção da partícula viral com outras moléculas à superfície da membrana celular das células hospedeiras^{36,53,54}. Outra alternativa também testada é a utilização de moléculas adicionais, como anticorpos multivalentes ou ligações entre biotina e streptavidina, para tentar promover a infecção viral. Estas moléculas funcionam como uma ponte de ligação entre as glicoproteínas virais e os receptores celulares. No entanto estudos realizados demonstram que a eficiência de infecção não foi significativamente melhorada

^{55,56}

1.6.5. Formação accidental de vectores retrovirais replicativos

Desde o início do desenvolvimento de linhas celulares produtoras de vectores retrovirais que a formação accidental de vectores replicativos é uma realidade com que os investigadores se têm vindo a deparar. A infecção de células de um paciente com estes vectores poderá fazer com que estas se transformem em células produtoras de vectores replicativos com capacidade de infectarem outras células o que poderá levar ao surgimento de efeitos indesejados e até letais, pois seria muito difícil de controlar a sua replicação. Estudos realizados em macacos Rhesus com vectores retrovirais replicativos produzidos em células derivadas de MLV, demonstram que estes conseguem replicar-se induzindo o aparecimento de linfomas ^{57,58}.

Existem dois mecanismos predominantes que podem gerar vectores retrovirais com capacidade replicativa, a recombinação e retroinfecção. Além da recombinação resultante da integração das construções no genoma celular para formar as *packaging cells*, devem ser considerados fenómenos de recombinação ao nível do DNA, após a estável integração das construções, e ao nível do RNA. Os primeiros resultam de processos mediados pela “maquinaria” de reparação das células. A recombinação ao nível do RNA está acoplada ao ciclo de vida viral sendo mediada pela transcriptase reversa. Para que a recombinação ao nível do RNA ocorra, é necessário que além da sequência que transporta o transgene, outra sequência de RNA também seja incorporada nas partículas virais. Apesar desta segunda sequência de RNA não possuir o sinal de empacotamento é possível que seja incorporada nas partículas virais, embora em quantidades mínimas ^{59,60}. Ao ocorrer recombinação entre a sequência com o sinal de empacotamento e o RNA derivado da transcrição das construções com os genes estruturais, podem-se formar vectores replicativos. Para evitar esta possibilidade, desenvolveram-se linhas celulares com duas unidades independentes de expressão dos genes virais que não devem ser incorporados nas partículas virais. Outro melhoramento é a utilização de sequência heterólogas nas construções de modo a diminuir a homologia entre sequências, como referido anteriormente.

Além dos RNA's das construções genéticas, também foi verificado a incorporação de RNA's celulares sem qualquer sequência viral (retroinfecção) ⁶¹. Caso ocorra recombinação destes RNA's celulares com o RNA que transporta o gene terapêutico, é pouco provável que se formem vectores replicativamente competentes. No entanto existe alguma preocupação quanto à utilização destes vectores pois os RNA celulares poderão transportar sequências que após integração no genoma das células infectadas poderão provocar efeitos adversos, como o caso de alguns oncogenes ⁶².

O genoma celular pode também conter naturalmente elementos retrovirais provenientes de retrovírus endógenos. Estes elementos podem ser introduzidos nas partículas virais e caso ocorra recombinação como já referido, poderão formar-se vectores retrovirais replicativos. Assim, um requisito na construção de linhas celulares para futura produção de

vectores retrovirais será a identificação da presença de sequências pertencentes a vírus endógenos no genoma celular das células produtoras de vectores^{27,62}

1.7. Problemas e soluções no desenvolvimento de linhas celulares produtoras de retrovírus

O desenvolvimento de linhas celulares produtoras de retrovírus envolve processos complexos e dispendiosos. Apesar de já se ter evoluído bastante na sua produção, os títulos virais obtidos para a maioria das linhas celulares não é muito elevado, sendo o tempo de meia-vida dos vectores retrovirais curto, cerca de 2-9 horas a 37°C⁶³⁻⁶⁵. Uma vez que os vários protocolos para utilização clínica necessitam de uma elevada quantidade de vectores retrovirais, como se pode observar na tabela 1.3, a produção destes é um ponto-chave a otimizar.

Tabela 1.3: Testes clínicos de terapia génica *ex-vivo* realizados no tratamento de imunodeficiências. Adaptado de Cruz *et al*, 2007.

Gene terapêutico	Doença	Células administradas	Dose por paciente (células transduzidas/kg)	Eficiência de transdução (%)	Células produtoras	Referências
Gp91 phox	X-CGD	Células cd34+ transduzidas	$3.6-5.1 \times 10^6$	40-45	PG13	(Ott et al., 2006)
Cadeia γ_c	SCID-X1		$5.7-6.1 \times 10^6$	20-40	ψ -CRIP	(Cavazzana-Calvo et al., 2000)
ADA	ADA-SCID	Limfócitos T transduzidos	$0.2-2.2 \times 10^6$	21-25	Gp+Am12	(Aiuti et al., 2002)
			$1-10 \times 10^9$	1-10	PA317	(Blaese et al., 1995)

Os títulos de vectores retrovirais dependem directamente de vários factores como a natureza da linha celular, as condições de cultura e a expressão dos genes necessários à produção das partículas virais. Em relação a este último factor, estudos realizados indicam que para se obter valores mais elevados de títulos virais é necessária uma elevada expressão da construção genética a ser incorporada nas partículas virais, bem como uma expressão elevada e com uma estequiometria adequada de todos os componentes do vector viral^{66,67}.

1.7.1. Linhas celulares

Muitas das primeiras *packaging cells lines* desenvolvidas derivam de linhas celulares de rato como por exemplo a NIH/3T3⁶⁸⁻⁷⁰, mas actualmente estas têm sido substituídas por linhas celulares humanas. Esta mudança deve-se a várias razões: foi descoberto que as células NIH/3T3 expressam várias sequências endógenas pertencentes a MLV⁷¹ o que não é desejado pelas razões de segurança já referidas; as modificações pós-tradução das proteínas como a glicosilação nas células de rato, permite ao sistema imunológico humano

detectar e rapidamente inactivar os vectores retrovirais; as linhas celulares de rato desenvolvidas não possuem títulos infecciosos elevados.

A linha celular 293 HEK (do inglês, *Human Embryonic Kidney*) tem sido bastante utilizada para desenvolver *packaging cells lines*. Para as *packaging cells lines* derivadas da linha celular 293 HEK tem sido verificado a ausência de sequências de MLV endógenos^{72,73} e que os vírus produzidos possuem uma maior eficiência de transdução^{72,74} quando comparados com a linha celular produtora de vectores retrovirais ψ -CRIP derivada de rato⁷⁵. Além disso, *packaging cells lines* derivadas de linhas celulares humanas produzem vírus mais resistentes à inactivação pelo sistema imunitário humano^{76,77}.

1.7.2. Desenvolvimento de *packaging cells lines* – expressão dos elementos virais

No desenvolvimento das *packaging cells lines*, as células são transfectadas com vectores de expressão (plasmídeos) que contêm os genes necessários à produção dos vectores retrovirais. Após a transfecção, alguns plasmídeos irão integrar-se naturalmente no genoma celular, o que permite a estável expressão dos genes heterólogos. Este processo de integração ocorre de uma forma aleatória⁷⁸. A expressão dos genes heterólogos poderá ser influenciada pela região do genoma celular onde estes se integraram e pelas regiões vizinhas, o que se irá traduzir em última análise em influências sobre as produtividades virais. Além de sequências como *enhancers*, *silencers*^{79,80} e até outros promotores⁸¹ que podem afectar directamente a transcrição, também podem existir elementos moduladores da cromatina⁸² que interfiram com a expressão dos genes heterólogos.

Geralmente, a transfecção das células com os vectores de expressão são eventos independentes. Após cada transfecção é necessário seleccionar um número elevado de clones para posterior análise, rastreio e caracterização da expressão dos genes heterólogos. Identificado um clone com uma expressão elevada dos genes heterólogos integrados no genoma celular, avança-se para a transfecção do seguinte plasmídeo, repetindo-se novamente todo o processo de selecção e análise de clones. A análise dos níveis de expressão de cada componente viral durante a construção das linhas celulares permite identificar e eliminar limitações de expressão existentes obtendo-se como resultado uma linha celular com uma elevada produtividade de vectores retrovirais. No entanto este processo é bastante demorado e dispendioso. Normalmente obtenção de um clone produtor de vectores retrovirais a partir de uma linha celular já com os genes *gag-pro-pol* e *env* demora, no mínimo, 6 meses⁸³.

Através do trabalho desenvolvido por Karreman *et al.* (1996), Schucht *et al.* (2006) e Coroadinha *et al.* (2006) foi delineada uma nova estratégia de produção das linhas celulares produtoras de vectores retrovirais. Esta estratégia consiste caracterização prévia de vários *loci* através da análise da expressão de um gene repórter que se encontra inserido num sistema de recombinação de troca de *cassette*. Após a selecção de um clone com apenas

uma cópia do sistema de recombinação de troca de *cassette* integrado no genoma celular, em que se verifica uma expressão elevada do gene repórter, o desenvolvimento da linha celular avança com a integração dos restantes elementos virais (*gag-pro-pol* e *env*) como já referido. No final do processo pretende-se obter uma linha celular caracterizada quanto à expressão de todos os elementos virais e do gene repórter. Esta linha celular pode agora servir de plataforma à produção de vectores retrovirais com diferentes genes terapêuticos sem a necessidade de se realizar um rastreio ao clone com uma elevada expressão do gene terapêutico uma vez que este pode ser inserido no *locus* previamente caracterizado onde se encontra o gene repórter, através do sistema de recombinação de troca de *cassette* ⁶².

Dados obtidos por Schucht *et al.* (2006) e Coroadinha *et al.* (2006) demonstram a eficiência do processo de recombinação específica sendo assim desnecessário o passo de rastreio de clones quanto à expressão do gene terapêutico uma vez que a estequiometria de expressão dos vários elementos do vector é mantida, o que permite prever os títulos virais produzidos.

Esta metodologia possui várias vantagens como: a expressão eficiente da sequência a ser incorporada nas partículas virais sem recorrer à utilização de marcadores selectivos que poderão ser prejudiciais às células a serem infectadas ^{84,85}; o estudo e adaptação prévia das células às condições propícias a maximizar a produtividade viral; a redução do tempo e custos necessários para desenvolver linhas celulares produtoras de vectores retrovirais ⁶².

1.7.3. Estequiometria dos componentes virais

A disrupção da estequiometria de expressão dos vários componentes virais (*transgene*, *gag-pro-pol* e *env*) provocada pela separação destes em várias construções genéticas, também pode contribuir para os valores moderados de produtividade das linhas celulares produtoras de vectores retrovirais ⁶⁷. Um estudo recente indica que os ratios de expressão entre os genes *gag-pro-pol/transgene* e *env/gag-pro-pol* são determinantes para o aumento de produtividade das linhas celulares e quando optimizados permitem diminuição da produção de partículas virais defectivas ⁸⁶. Estas últimas representam um grande problema no que respeita à purificação dos vectores virais pois como possuem características físicas e químicas iguais ou semelhantes às dos vectores infecciosos torna-se impossível separá-las aquando os processos de purificação. A presença de uma elevada percentagem de vectores virais defectivos irá ter como consequência a redução da eficiência de transdução além da possibilidade de provocar efeitos adversos nos pacientes ⁶².

A estequiometria de expressão dos vários elementos virais é assim também um ponto-chave a optimizar de modo a contribuir para aumentar a produtividade de partículas virais infecciosas e melhorar a qualidades dos títulos virais diminuindo o número de partículas virais defectivas.

1.8. Sistemas de recombinação de troca de *cassette*

Na natureza existem sistemas de recombinação heteróloga que permitem a recombinação específica entre determinadas sequências. Alguns destes são hoje em dia utilizados como ferramentas em engenharia genética. Os mais utilizados em estudos com células de mamífero são o sistema Flp/FRT existente na levedura *Saccharomyces cerevisiae*⁸⁷ e o sistema Cre/loxP do bacteriófago P1⁸⁸. Em ambos, as enzimas Flipase e Cre reconhecem sequências nucleotídicas específicas, FRT (do inglês, *flipase recombinase target sites*) e loxP, respectivamente. Estas enzimas promovem, um processo de recombinação entre as respectivas sequências, genericamente designadas de RTs (do inglês, *recombination target sites*).

Os processos de recombinação específica referidos têm sido utilizados em células de mamífero para introduzir *cassettes* de expressão em regiões pré-definidas do genoma celular (figura 1.16). Esta técnica é designada de recombinação de troca de *cassette*, RMCE (do inglês, *recombinase-mediated cassette exchange*) e envolve dois passos. O primeiro designado de “tagging” consiste na introdução de uma *cassette* flanqueada por duas sequências RT heteroespecíficas incompatíveis no genoma celular. Este processo de integração no genoma celular ocorre de uma forma aleatória. Posteriormente é efectuado o “targeting” que consiste na troca da *cassette* por outra flanqueada pelas mesmas sequências RT heteroespecíficas, sendo este processo mediado por uma recombinase⁸⁹.

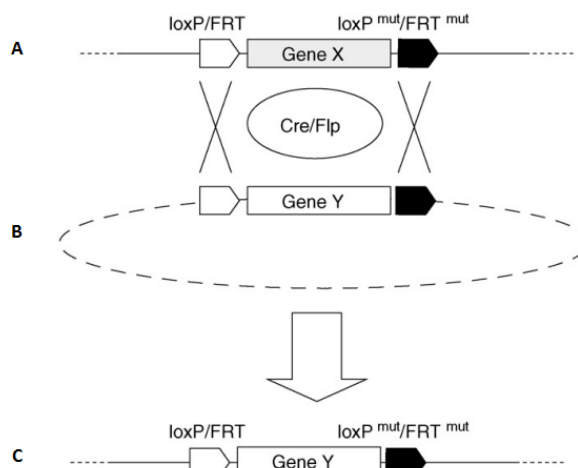


Figura 1.16: Princípio de funcionamento do sistema de recombinação de troca de *cassette* mediado pelos sistemas Flp/FRT e Cre/loxP. A- região do genoma celular com a primeira *cassette* genética flanqueada pelas sequências RT heteroespecíficas e incompatíveis após o “tagging”. Neste caso é utilizada uma região RT mutada. B- vector com a *cassette* desejada, flanqueada pelas mesmas sequências RT heteroespecíficas e incompatíveis. C- genoma celular após a ocorrência de recombinação de troca de *cassette* (“targeting”). Adaptado de Wirth, D. *et al*, 2007.

1.9 Objectivos

Neste trabalho pretende-se desenvolver bases para a construção de linhas celulares produtoras de vectores retrovirais sem capacidade replicativa e com diferentes tropismos, a partir das células 293#3 gp 11 e 293#3 gp22.

De modo a alcançar o pretendido, os principais objectivos deste trabalho são: a construção de três vectores de expressão (plasmídeos) com os genes *env 10A1*, *4070A* e *GalV10A1*, a construção de um vector de expressão com o gene *env 4070A* inserido numa *cassette* que irá permitir a sua substituição através do sistema recombinação de troca de *cassette* mediado pela enzima Cre e a confirmação da funcionalidade de todos os plasmídeos construídos em relação à expressão dos respectivos genes *env*, nas células 293#3 gp 11 e 293#3 gp22. Adicionalmente serão optimizadas condições de transfecção e pressão selectiva. Numa fase final as células 293#3 gp 11 e 293#3 gp22 serão transfectadas com os plasmídeos produzidos e os clones obtidos serão analisados e comparados com outras linhas celulares produtoras de vectores retrovirais já estabelecidas.

1.10. Células 293#3 gp11 e 293#3 gp22

As células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 pertencem a uma população precursora de uma linha celular produtora de vectores retrovirais, a 293 FLEX.

Ambas as células 11 e 22 possuem duas *cassettes* genéticas integradas no seu genoma, uma com os genes *gag-pro-pol* e outra com o transgene, as mesmas para ambas as células. A construção genética com o transgene possui ainda a particularidade de se encontrar flanqueada por duas regiões FRT o que permite a sua eficiente substituição através do sistema de recombinação de troca de *cassette* mediado pela enzima Flipase como se pode observar na seguinte figura 1.17:

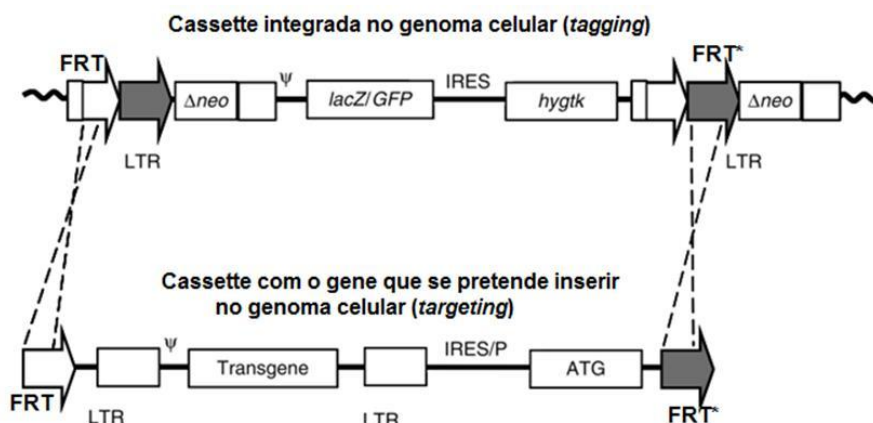


Figura 1.17: Sistema de recombinação de troca de *cassette* mediado pela enzima Flipase nas células 293 FLEX. Adaptado de Coroadinha *et al*, 2006.

Nas células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 ocorre a formação de cápsides virais, chegando mesmo a ser segregadas partículas virais para o meio extracelular. No entanto nenhuma destas partículas é infecciosa devido à ausência as glicoproteínas codificadas pelo gene *env*.^{39,86}

A origem das células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 encontra-se representada na figura 1.18. O seu desenvolvimento teve início na transdução das células 293 HEK com vectores retrovirais que transportavam a *cassette* de expressão do transgene (figura 1.17), permitindo assim a sua integração no genoma celular. O clone 293#3 resultante foi escolhido, entre os

inúmeros clones formados, para se avançar com o desenvolvimento da linha celular. As razões da sua escolha são: i) contem apenas uma cópia da *cassette* com o transgene integrado no seu genoma; ii) apresenta uma elevada expressão da mesma. Assim, posteriormente, o clone 293#3 foi transfectado com um plasmídeo que contem a *cassette* de expressão com os genes *gag-pro-pol*. Esta *cassette* terá se integrado no genoma celular de algumas células, formando-se assim vários clones entre os quais os 293#3 gp11 e 293# gp22 ³⁹.

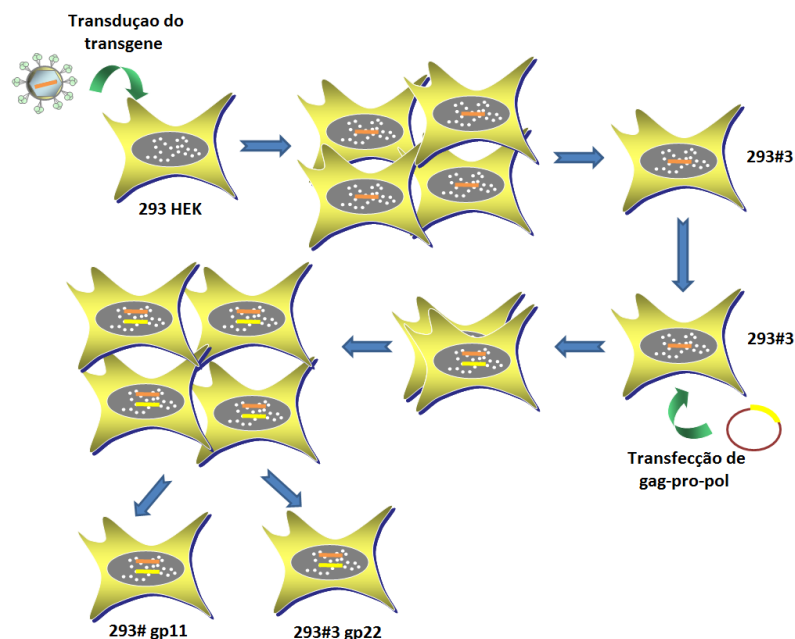


Figura 1.18: Desenvolvimento das células 293#3 gp11 e 293#3 gp22.

As células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 são idênticas em relação à expressão do transgene, no entanto o mesmo já não acontece em relação à expressão dos genes *gag-pro-pol* sendo a intensidade da expressão destes genes significativamente maior no clone 11 em relação ao clone 22. Uma vez que a *cassette* de expressão dos genes *gag-pro-pol* é a mesma para ambas as células, as diferenças de expressão deverão dever-se aos diferentes locais de integração da *cassette* com os genes *gag-pro-pol* no genoma celular e ao diferente número de cópias da *cassette* integradas.

Para as células referidas produzirem partículas virais infecciosas, só é necessário que estas expressem adicionalmente um gene *env*.

Sabendo que para ambas as células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 a expressão do transgene é idêntica, que para as células 293#3 gp22 a expressão de transgene não é limitante em relação à expressão de *gag-pro-pol* e que estas possuem uma menor expressão de *gag-pro-pol* em relação às células 293#3 gp11 ⁸⁶, ao serem utilizadas estas últimas é dada a oportunidade de se originarem células com uma maior produtividade viral caso a expressão do gene *env* seja suficientemente elevada.

No entanto, a possibilidade de se formar um elevado número de cápsides virais, devido à elevada expressão dos genes *gag-pro-pol* nas células 293#3 gp11, poderá fazer com que a quantidade mínima necessária de glicoproteínas codificadas pelo gene *env* para se produzir partículas virais infecciosas também seja maior. Esta hipótese será verdadeira supondo-se que as glicoproteínas codificadas pelo gene *env* são distribuídas pelo elevado número de cápsides virais de uma forma relativamente homogénea. Esta distribuição poderá fazer com que a quantidade de glicoproteínas codificadas pelo gene *env* por partícula viral não seja suficiente para esta se tornar infecciosa.

Se a distribuição das glicoproteínas pelas cápsides virais formadas ocorrer de uma forma mais heterogénea, a quantidade mínima necessária de glicoproteínas Env para se formarem partículas virais infecciosas poderá ser menor. No entanto irão ser também originadas em grande número, partículas virais defectivas com poucas ou nenhuma proteínas Env, o que não é desejado pelas razões já referidas (ver secção 1.7.3 Estequiometria dos componentes virais).

O facto de se utilizar ambas as células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 no desenvolvimento das linhas celulares produtoras de vectores retrovirais e não apenas as células 293#3 gp11, que teoricamente apresentam condições para se formarem células produtoras de vectores retrovirais com produtividades mais elevadas, tem a ver com a probabilidade de se obter as linhas celulares e produtividades virais desejadas. Esta probabilidade está directamente relacionada com a necessidade de se obter uma estequiometria adequada entre os 3 vectores de expressão. Na tabela 1.4 encontra-se sumariado as vantagens e desvantagens na utilização das células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 para o desenvolvimento de linhas celulares produtoras de vectores retrovirais.

Para ambas as células 293#3 gp 11 e 293#3 gp 22 espera-se que quanto maior for a expressão do gene *env*, até a expressão deste deixar de ser limitante, maior será o número de partículas virais infecciosas e menor o número de partículas defectivas produzidas.

Tabela 1.4: Vantagens e desvantagens da utilização das células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 no desenvolvimento de linhas celulares produtoras de vectores retrovirais

	Vantagens	Desvantagens
293#3 gp11	- Potencial de se obter títulos virais elevados (devido à elevada expressão de <i>gag-pro-pol</i>)	- Dificuldade de se obter títulos virais com uma baixa percentagem de partículas virais defectivas (devido à requisição de uma expressão elevada do gene <i>env</i>)
293#3 gp22	- Facilidade de se obter títulos virais com uma baixa percentagem de partículas virais defectivas - Já foram obtidos títulos virais elevados a partir células produtoras de vectores virais derivadas das células 293#3 gp22 ³⁹	- A expressão de <i>gag-pro-pol</i> é limitante na produção de partículas virais para valores elevados de expressão do gene <i>env</i>

2. Materiais e Métodos.

2.1. Material biológico

2.1.3. Linhas celulares

As células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 ³⁹ derivam da linha celular 293 HEK (do inglês, *Human Embryonic Kidney*) número ATCC (do inglês, *American Type Culture Collection*) CRL-1573 e foram utilizadas para desenvolver as novas linhas celulares produtoras de vectores retrovirais.

A linha celular 293 FLEX ³⁹ foi utilizada como controlo positivo na caracterização das novas linhas celulares geradas.

As células Te671 (ATCC CRL-8805) foram utilizadas para serem infectadas pelas partículas virais infecciosas produzidas pelas células produtoras de vectores retrovirais.

2.1.4. Bactérias

As bactérias One Shot® Stbl3™ (genótipo: F- mcrB mrr hsdS20 (rB-, mB-) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Str) xyl-5 λ- leu mtl-1r) Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) foram utilizadas para a produção de plasmídeos.

2.1.5. Plasmídeos

Os plasmídeos pHGaLV10A1 e pENVA (Anexo V e VI) possuem as sequências que codificam para as glicoproteínas recombinante GaLV10A1 e viral 4070A respectivamente, tendo sido gentilmente cedidos pelo Dr. Otto Merten (Genethon, França). O plasmídeo comercial pVPack-10A1 (Stratagene, Santa Clara, Califórnia, E.U.A.) (Anexo VII) possui a sequência que codifica para a glicoproteína viral 10A1. Foi a partir destes plasmídeos que foram amplificadas as sequências com os genes *GaLV10A1*, *4070A* e *10A1* respectivamente.

O plasmídeo comercial pMONO-zeo-mcs (InvivoGen, San Diego, Califórnia, E.U.A) é o vector de expressão onde foram inseridas as sequências com os genes *GaLV10A1*, *4070A* e *10A1*.

O plasmídeo comercial pSELECT-GFPzeo-LacZ (InvivoGen) (Anexo X) possui uma sequência que codifica para uma proteína GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*). Este plasmídeo foi utilizado como controlo positivo nos ensaios de transfecção.

O plasmídeo pTagLoxP-mcs (Anexo X) foi desenhado no âmbito deste trabalho pela Dr.^a Ana Coroadinha e sintetizado pela GENEART (Regensburg, Germany). Este plasmídeo contém uma *cassette* de expressão flanqueada por regiões LoxP que irão permitir o funcionamento do sistema de recombinação de troca de *cassette* mediado pela enzima Cre. É nesta *cassette* que será inserida a sequência amplificada com o gene 4070A.

2.2. Cultura, manutenção e propagação das células animais

Foi efectuado um banco celular de todas as células animais referidas anteriormente, tendo sido o trabalho aqui descrito desenvolvido a partir destas células congeladas. O banco celular foi desenvolvido a partir de células em cultura. Estas foram congeladas a -80°C em CryoTubes™ (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Alemanha) de 1,5 ml, numa solução de FBS (do inglês, *Fetal Bovine Serum*; Gibco, Paisley, Reino Unido) com 5% de DMSO (do inglês, *Dimethyl sulfoxide*; Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A).

Para descongelar as células anteriores e as manter em cultura, as células passaram por um processo de descongelamento da alíquota em água a 37°C . Quando a alíquota se encontrava totalmente descongelada, todo o volume desta foi passado para um *T-Flask* (BD Falcon™, Erembodegem, Bélgica) com DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Gibco) suplementado com 10% (v/v) de FBS (Gibco) previamente e tamponizado e aquecido na incubadora com atmosfera húmida a 7% de CO_2 e a uma temperatura de 37°C . O *T-Flask* foi colocado novamente na incubadora por um período de 3 horas para que as células sedimentem e adiram à sua superfície que está tratada para este efeito. Ao fim deste período o meio de cultura foi trocado por meio novo pois o DMSO (Sigma-Aldrich) torna-se tóxico para as células à temperatura ambiente.

Nas condições referidas as células irão replicar-se formando uma monocamada. Quando as células atingiram cerca de 90% de confluência da superfície do *T-Flask* o sobrenadante foi aspirado e a monocamada lavada com DPBS (do inglês, *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) (Gibco) sem cloreto de magnésio e sem cloreto de cálcio. Este foi posteriormente aspirado com o objectivo de remover todo o meio de cultura anterior, pois o FBS possui componentes que inibem a tripsina (Gibco) que foi posteriormente adicionada para fazer com que as células desadiram da superfície do *T-Flask*. Estando as células em suspensão foi adicionado novo DMEM (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de FBS (Gibco) para inibir a acção da tripsina e diluir as células. Dependendo da diluição desejada é retirado determinado volume da suspensão celular e colocada num novo *T-Flask* com novo DMEM (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de FBS (Gibco) até que estejam suficientemente confluentes para serem passadas novamente.

Todos os procedimentos realizados com as células animais foram efectuados em condições estéreis em câmaras de fluxo laminar Nuair (tipo II), utilizando material estéril descartável ou autoclavado por um período de 90 minutos à temperatura de 121°C e à pressão de 1,2 bar.

2.3. Amplificação das sequências com os genes *env* *GaLV10A1*, *4070A* e *10A1*

As sequências com os genes *env* foram amplificadas por PCR (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*) a partir dos plasmídeos *pGaLV10A1*, *pENVA* e *pVPack-10A1*, utilizando

os *primer's* representados na tabela 2.1. Os *primers forward* (FW) e *reverse* (RV) utilizados nesta reacção possuem na extremidade 5' uma sequência reconhecida por endonucleases, as mesmas sequências que também existem no *multiple cloning site* do plasmídeo pMONO-zeo-mcs, onde se pretende inserir as sequências amplificadas. As enzimas de restrição escolhidas não poderão efectuar outras restrições para além das localizadas no *multiple cloning site* do vector e das extremidades das sequências amplificadas de modo a não originarem outros produtos. Ao utilizar enzimas de restrição, que originam diferentes extremidades coesivas, para cada *primer*, irá ser assegurada inserção da sequência amplificada na posição desejada.

Foram realizadas três reacções de amplificação com diferentes temperaturas (42°C, 47°C e 52°C) de emparelhamento dos *primer's* com a sequência a amplificar utilizando a enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, E.U.A.)

Os *primer's* utilizados para a amplificação dos genes *env* foram sintetizados pela Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, E.U.A.).

Tabela 2.1: *Primer's* utilizados para amplificação das sequências com os respectivos genes *env*.

Gene <i>env</i>		Primer
Galv10A1	FW	5'- ATGAGGATCCTGTTTTGACCTCCATAGAAG -3'
	RV	5'- TAGTCCTAGGGCCGATGATTAATTGTCAAC -3'
10A1	FW	5'- ATGAACCGGTTAGAGAACCCACTGCTTACT -3'
	RV	5'- TAGTCCTAGGGTTATCATGGCTCGTACTCT -3'
4070A	FW	5'- ATGAACCGGTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTC -3'
	RV	5'- TAGTCCTAGGTACATAAGCGGATAACGGAT -3'
4070A*	FW	5'- ATGAACCGGTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTC -3'
	RV	5'- TAGTGCATGCTACATAAGCGGATAACGGAT -3'

**Primer's* utilizados na amplificação do gene 4070A a ser inserido no plasmídeo pTagLoxP-mcs

2.4. Construção dos plasmídeos pMONO-zeo-GalV10A1, pMONO-zeo-4070A, pMONO-zeo-10A1 e pTagLoxP-4070A

A construção dos plasmídeos pMONO-zeo-GalV10A1, pMONO-zeo-4070A, pMONO-zeo-10A1 e pTagLoxP-4070A envolveu em primeiro lugar a purificação das sequências amplificadas anteriormente. Antes de se proceder à sua purificação, os amplicões foram separados do plasmídeo que lhes deu origem através de uma electroforese em gel de agarose. Após a excisão do pedaço de agarose com o amplicão, este foi purificado através do *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE LifeSciences, Madrid, Espanha). De seguida foram efectuadas reacções de restrição independentes do plasmídeo pMONO-zeo-mcs e das sequências anteriormente amplificadas com as respectivas enzimas de restrição tabela 2.2. Os produtos de restrição foram novamente purificados com *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare) sendo as extremidades do plasmídeo pMONO-zeo-mcs posteriormente desfosforiladas pela enzima *Antarctic Phosphatase* (New England Biolabs (NEB), Ipswich, Massachusetts, E.U.A.). Por fim as sequências amplificadas e respectivos plasmídeos pMONO-zeo-mcs e pTagLoxP-mcs

(ambos na forma linear e desfosforilados) foram submetidos a uma reacção de ligação promovida pela enzima *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs).

Tabela 2.2: Enzimas (NEB) utilizadas nas reacções de restrição para a construção dos vectores de expressão com os respectivos genes *env*.

Reacções de restrição						
Sequências nucleotídicas	pMONO-zeo-mcs	pTagLoxP-mcs	GalV10A1	10A1	4070A	4070A*
Enzimas de restrição	BamHI + AvrII	AgeI + SphI	BamHI + AvrII	AvrII + AgeI	AvrII + AgeI	AgeI + SphI
	AvrII + AgeI					

2.5. Produção de plasmídeos

Os plasmídeos anteriormente referidos e os vectores construídos neste trabalho foram todos produzidos utilizando o mesmo método, que consiste na transformação de bactérias comerciais quimicamente competentes, seguida de plaqueamento das mesmas em meio sólido LB com antibiótico ficando cerca de 16 horas a 37°C. Após o aparecimento de colónias, são inoculados 200 ml de meio líquido TB com o respectivo antibiótico ficando a incubar a 37°C durante 15 horas a 180 rpm. Quando a suspensão celular atingiu uma densidade óptica entre 4 e 8 as células foram recolhidas por centrifugação e o plasmídeo produzido foi extraído e purificado utilizando o sistema Genopure Plasmid maxi kit (Roche, Basel, Suíça). Após a purificação foi realizada uma reacção de restrição sendo posteriormente analisada por uma electroforese em gel de agarose 1% (p/v).

2.6. Estudos de curva-de-morte

Inocularam-se placas de 12 poços (Nunc) com 1 ml de suspensão celular a uma concentração de $4,4 \times 10^4$ células/ml, com as respectivas concentrações dos antibióticos Zeocina (150 µg/µl, 200 µg/µl e 300 µg/µl) (InvivoGen) e Puromicina (0,5 µg/µl e 1 µg/µl) (InvivoGen). Aproximadamente a cada 24 horas, as células de 1 poço foram recolhidas com 300 µl de tripsina (Gibco) e 500 µl de DMEM (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de FBS (Gibco) para ser determinada a concentração celular.

2.7. Transfecções com fosfato de cálcio, PEI (polietilenamina) e subsequente pressão selectiva

Para ambos os métodos de transfecção com fosfato de cálcio (Sigma-Aldrich) e PEI (Polysciences, Eppelheim, Alemanha), foram inoculadas placas de 6 poços (Nunc) com 2ml de uma suspensão celular a 6×10^5 célula/ml em DMEM (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de FBS (Gibco). Após a inoculação as placas foram colocadas a 37°C na incubadora com atmosfera humidificada a 7% CO₂. No dia seguinte foram adicionados 300 µl das respectivas soluções de transfecção às células com diferentes quantidades de plasmídeo (0,5 µg, 1 µg, e 2 µg), ficando novamente a incubar durante a noite nas condições referidas. No caso das transfecções com os vectores de expressão, após esse período o meio de cultura foi trocado por meio novo e 24 horas depois recolhido, filtrado (0,45 µm) e

armazenado a -80°C . Às células foi adicionado meio de cultura com 150 $\mu\text{g/ml}$ de Zeocina (InvivoGen) para se iniciar a pressão selectiva.

2.8. Electroporação e subsequente pressão selectiva

A electroporação foi realizada utilizando o sistema Neon Transfection System (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). As condições da electroporação (voltagem, número e duração dos pulsos eléctricos) utilizadas foram as recomendadas pelo fabricante para as células 293 em transfecções com um volume de 100 μl . Com as células 293#3 gp11 foi utilizada a concentração celular 5×10^7 células/ml e para as células 293#3 gp22 foi utilizada uma concentração 10x inferior. Após a electroporação das suspensões celular com as respectivas quantidades de plasmídeo (0,5 μg , 1 μg e 2 μg), estas foram inoculadas num poço de placa de 6 poços (Nunc) com DMEM (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de FBS (Gibco) previamente aquecido a 37°C na incubadora com atmosfera humidificada a 7% CO_2 . No dia seguinte o meio foi recolhido, filtrado e guardado a -80°C sendo adicionado às células meio de cultura novo com 150 $\mu\text{g/ml}$ de Zeocina (InvivoGen).

2.9. Selecção de clones (*limiting dilution*) e rastreio das produtividades virais

O *limiting dilution* foi realizado em placas de 96 poços (Nunc). A estes foram adicionados 100 μl de meio de cultura condicionado previamente aquecido na incubadora a 37°C com atmosfera humidificada a 7% CO_2 . De seguida os poços foram inoculados com 100 μl de uma suspensão celular com uma concentração celular 10 células/ml em DMEM (Gibco) suplementado com 30% (v/v) de FBS (Gibco) e com 75 $\mu\text{g/ml}$ de Zeocina (InvivoGen). Aos poços das extremidades da placa foi adicionado 100 μl de PBS (Gibco) de modo a evitar que a placa seque. De seguida a placa foi colocada na incubadora a 37°C com atmosfera humidificada a 7% CO_2 .

Nos poços em que se verificou o aparecimento de uma única colónia, quando esta atingiu um tamanho considerável foi recolhida e inoculada num poço de uma placa de 24 poços (Nunc) com 1 ml de DMEM (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de FBS (Gibco) com 75 $\mu\text{g/ml}$ de Zeocina (InvivoGen). À medida que as células cresciam foram sendo recolhidas e inoculadas em placas de 6 poços com o dobro do volume do meio de cultura e o dobro da concentração de antibiótico anterior repetindo-se o processo mas agora inoculando as células num *T-Flask* de 25 cm^2 com 5 ml de meio de cultura com 150 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina (InvivoGen) até atingirem a cerca de 80% de confluência da área do poço para serem congeladas a -80°C .

Aquando o congelamento das células, alguma foram inoculadas num poço de uma placa de 6 poços (Nunc) com 2 ml de DMEM (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de FBS (Gibco) e 150 $\mu\text{g/ml}$ de Zeocina (InvivoGen). Quando este poço se encontrava 80% confluyente em células, o meio de cultura foi trocado por meio novo sem antibiótico sendo recolhido e filtrado 24 horas depois para posterior análise do título viral.

2.10. Técnicas analíticas

2.10.3. Contagem das células

Para determinar a concentração e viabilidade celular, foram utilizados neste trabalho, dois métodos de contagem de células vivas e mortas. O método mais utilizado foi o método de exclusão do azul de tripano através de observação directa ao microscópio óptico de contraste de fase, utilizando a câmara de contagem Fuchs-Rosenthal (Brand, Wertheim, Alemanha). Neste foi utilizado uma solução de azul tripano (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,1% (v/v) em PBS. Ao adicionar a solução de corante à suspensão celular, foi possível a distinção entre células vivas e mortas pois as últimas são permeáveis ao corante ficando azuis, ao contrário das primeiras.

O outro método utilizado foi a contagem através do aparelho CASY®1, Schärfe System GmbH (Reutlingen, Alemanha). Este aparelho foi utilizado para determinar a concentração e viabilidade celular para os estudos de titulação dos clones obtidos após o processo de limiting dilution.

2.10.2. Titulação das partículas virais infecciosas

Para titular as partículas virais infecciosas foram inoculadas placas de 96 poços (Nunc) com 100µl uma suspensão de células de Te671 em DMEM (Gibco) suplementado com 10% (v/v) FBS (Gibco) a uma concentração de $1,65 \times 10^5$ células/ml. Depois de inoculadas, as placas foram colocadas a incubar por 24 horas a 37°C na incubadora com atmosfera humidificada a 7% CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi aspirado dos poços e procedeu-se à infecção das células em triplicado sendo adicionados 50 µl da suspensão viral previamente diluída em DMEM (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de FBS (Gibco) e com 8 µg/ml de polibereño (Sigma-Aldrich). As células foram colocadas novamente a incubar entre 3 a 4 horas nas condições anteriormente referidas sendo posteriormente adicionados 150 µl de meio de cultura novo, ficando a incubar por 48 horas nas condições referidas. Após este último período de incubação as células foram fixadas: o meio foi removido, as células foram lavadas com DPBS e ficaram a incubar à temperatura ambiente com 100 µl de uma solução de DPBS (Gibco) com 0,3 % (v/v) formaldeído (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 1,35% (v/v) gluteraldeído (Sigma-Aldrich) durante 3 minutos. Depois de fixadas, as células foram novamente lavadas com 100 µl de DPBS (Gibco) e foi adicionada uma solução com 0,2 mg/mL de x-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosídeo) (Stratagene), 5mM K₃Fe(CN)₆ (Merck, Darmstadt, Alemanha), 5mM K₄Fe(CN)₆ (Merck), e 1mM MgCl₂ (Merck) em DPBS (Gibco).

O título viral foi determinado através da equação:

$$Titulo\ viral = \frac{x_{medio}}{V} \times y \quad (eq, 1)$$

onde $x_{média}$, V e y são respectivamente a média do número de células coradas nos triplicados, o volume de infecção (0,05 ml) e o factor de diluição da solução viral.

2.11. Estudos de crescimento

Os estudos de crescimento foram efectuados em *T-flask's* de 25 cm². Estes foram inoculados com 5 ml de uma suspensão celular 2×10^5 células/ml em DMEM (Gibco) suplementado com 10% (v/v) FBS (Gibco). Os *T-Flask's* foram colocados a incubar a 37°C na incubadora com atmosfera humidificada a 7% CO₂. Aproximadamente a cada 24 horas as células de um *T-Flask* foram recolhidas para se determinar a concentração celular de células viáveis e foi recolhida uma amostra do sobrenadante, que depois de filtrada (0,45 µm), foi armazenada a - 80°C para posteriormente se determinar o número de partículas virais infecciosas.

2.12. Determinação da taxa específica máxima de crescimento e da produtividade viral

A taxa específica de crescimento máxima (μ_{max}) foi determinada de acordo com a equação 2 utilizando os valores de concentração de células viáveis referentes à fase exponencial de crescimento das células:

$$\mu_{max} = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (\text{eq. 2}),$$

onde dx e x representam respectivamente a variação da concentração de células viáveis no intervalo de tempo dt e a concentração média de células viáveis nesse intervalo de tempo.

A produtividade viral foi determinada a partir da equação:

$$\text{Produtividade viral} = \frac{[p.i.]}{[células viáveis]} \quad (\text{eq. 3}),$$

onde [p.i.] representa o número de partículas virais infecciosas por unidade de volume, e [células viáveis] o número de células viáveis por unidade de volume.

2.13. Análise estatística

O erro associado a cada medição foi determinado ou pelo desvio padrão de diferentes leituras independentes ou assumindo o valor de erro da leitura para cada medição anunciado pelo fabricante dos equipamentos utilizados.

Para a determinação do número de partículas infecciosas por milhão de células foi calculado o erro propagado através da lei da propagação do erro para uma função de multivariáveis:

$$\Delta f \approx \Delta x_1 \cdot \left(\frac{\partial f}{\partial x_1} \right) + \Delta x_2 \cdot \left(\frac{\partial f}{\partial x_2} \right) + \dots + \Delta x_n \cdot \left(\frac{\partial f}{\partial x_n} \right) \quad (\text{eq. 4})$$

3. Resultados e discussão

Neste trabalho, foram construídos e produzidos três vectores de expressão (plasmídeos) com diferentes genes *env* e um vector de expressão com um sistema de recombinação de troca de *cassette*. Para comprovar funcionalidade dos vectores de expressão relativamente à expressão dos genes *env*, as células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 foram transfectadas com os plasmídeos. Posteriormente, com a aplicação da pressão selectiva após a adição de antibiótico ao meio de cultura, pretendeu-se obter clones produtores de vectores retrovirais.

Para comprovar a funcionalidade do sistema de recombinação de troca de *cassette* para o gene *env*, a sua troca tem que ser efectuada através de nova transfecção e selecção de clones.

Assim neste trabalho começou-se por efectuar estudos de curva-de-morte e de transfecção para averiguar quais as condições mais apropriadas a utilizar no desenvolvimento das linhas celulares.

3.1. Estudos de curva-de-morte

Os estudos de curva de morte têm como objectivo determinar qual a melhor concentração de antibiótico a utilizar durante a pressão selectiva de modo a permitir sobrevivência das células transfectadas e a induzir a morte das células não transfectadas num intervalo de tempo. A longo prazo, esta pressão selectiva permite apenas a sobrevivência das células em que ocorreu integração dos plasmídeos no genoma celular e consequentemente a expressão estável da sua *cassette* genética onde se encontra o gene que confere resistência ao antibiótico.

Foram realizados estudos de curva de morte com dois antibióticos, a Zeocina e a Puromicina (figuras 3.1 e 3.2, respectivamente). O primeiro antibiótico foi utilizado para seleccionar as células transfectadas com os plasmídeos com diferentes genes *env* e com o plasmídeo que possui o sistema de recombinação de troca de *cassette*. A Puromicina será utilizada para seleccionar as células em que ocorreu a troca de *cassette*.

Como se pode observar na figura 3.1, para ambas as células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 verificou-se o decréscimo da concentração de células viáveis ao longo do tempo para todas as concentrações de antibiótico testadas, à excepção do controlo negativo (0 µg/ml Zeocina). Neste último, observou-se o aumento exponencial da concentração de células viáveis ao longo do tempo. Também em ambos os casos não se verificaram diferenças significativas no decréscimo da concentração celular entre as várias concentrações de antibiótico testadas. A semelhança de comportamento para ambas as células está de acordo com o previsto uma vez que ambas apenas diferem na expressão dos genes *gag-pro-pol*. Destaca-se apenas o valor elevado de concentração celular ao fim das primeiras

24h após a adição dos 300 µg/ml de antibiótico ao meio de cultura para as células 293#3 gp11. Este valor parece não estar de acordo com os restantes para o mesmo tempo de pressão selectiva. Seria de esperar que quanto maior a concentração de antibiótico, menor o valor da concentração de células viáveis nos momentos iniciais do estudo, tal como se verificou para as células 293#3 gp22, embora neste último caso a diferença seja muito ligeira. No entanto para todos os outros pontos do estudo verificou-se que a concentração de células viáveis para os 300 µg/ml de antibiótico é menor ou igual aos valores obtidos para as restantes concentrações de antibiótico testadas.

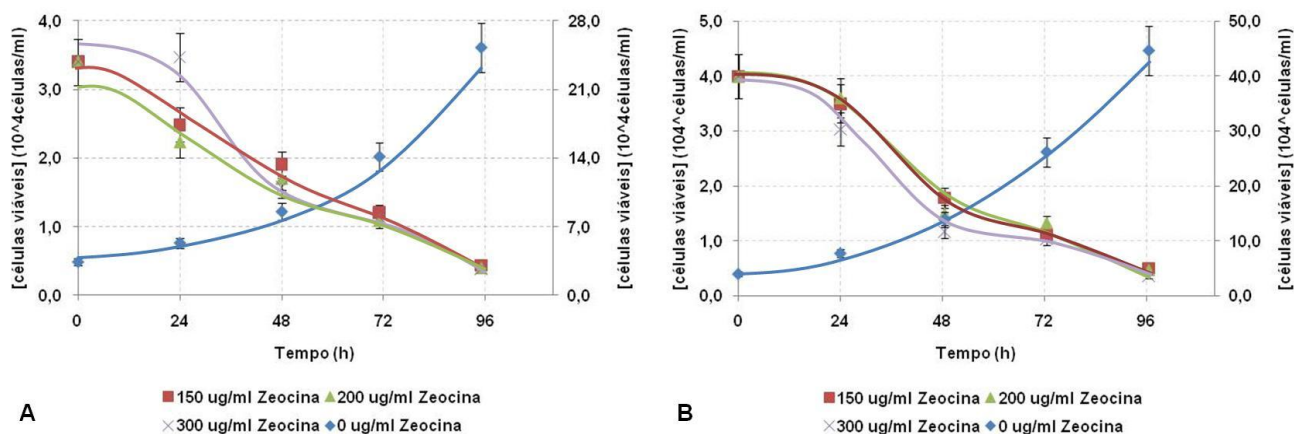


Figura 3.1: Curvas-de-morte com o antibiótico Zeocina. A- Curvas-de-morte para as células 293#3 gp11. B- Curvas-de-morte para as células 293#3 gp22. O eixo secundário das ordenadas refere-se à concentração de células viáveis do controlo negativo.

Uma vez que se demonstrou não existirem diferenças significativas entre as três concentrações de Zeocina testadas, visto todas realizarem a pressão selectiva desejada, seleccionou-se a concentração inferior (150 µg/mL) para ser usada nas pressões selectivas.

Um estudo semelhante ao realizado para a Zeocina foi efectuado para a Puromicina (figura 3.2). Neste último também se observou para ambas as células um decréscimo da concentração de células viáveis com o tempo para todas as concentrações de antibiótico testadas à excepção do controlo negativo (0 µg/ml Puromicina). Neste observou-se o aumento exponencial da concentração de células viáveis ao longo do tempo.

Na figura 3.2, para ambas as células é evidente que a concentração de antibiótico de 1 µg/ml induz uma pressão selectiva mais forte, que se traduz numa maior velocidade de morte. No entanto o valor de concentração de células viáveis ao fim de 96 horas é muito semelhante para as duas concentrações de antibiótico testadas em ambas as células.

De modo a exercer uma forte pressão selectiva nas primeiras 24-48 horas e assim evitar crescimento celular de células não transfectadas como se observa nas células 293#3 gp22, a concentração de antibiótico escolhida para utilizar nas futuras transfecções foi de 1 µg/ml de Puromicina.

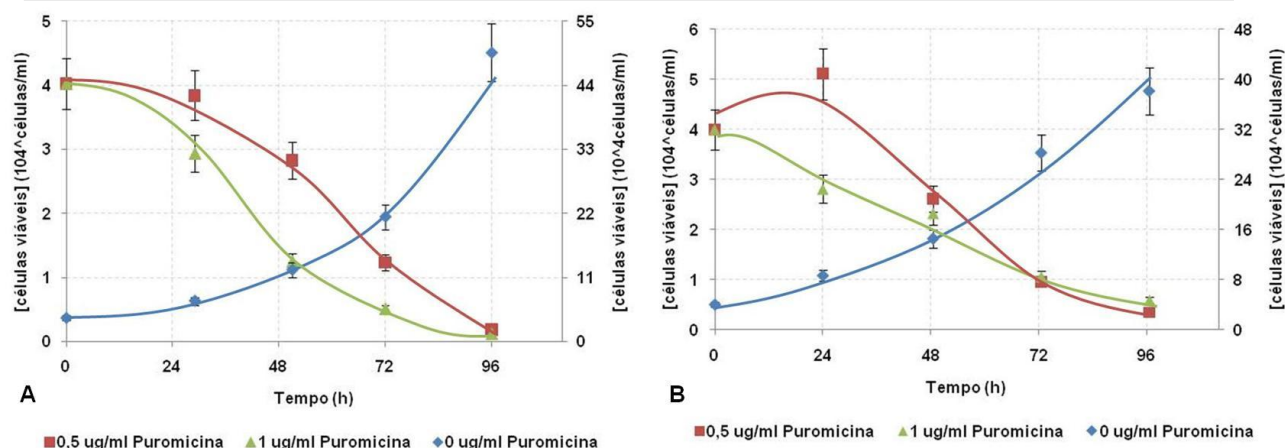


Figura 3.2: Curvas-de-morte com o antibiótico Puromicina. A- Curvas-de-morte para as células 293#3 gp11. B- Curvas-de-morte para as células 293#3 gp22. O eixo secundário das ordenadas refere-se à concentração de células viáveis do controlo negativo.

3.2. Produção do plasmídeo pSELECT-GFPzeo-LacZ

Nos estudos de transfecção foi utilizado o plasmídeo pSELECT-GFPzeo-LacZ (Anexo IV) que possui um gene que codifica para uma GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*). Este gene teve a função de gene repórter nos estudos de transfecção.

Após a produção do plasmídeo realizou-se uma reacção de restrição do mesmo com a endonuclease *BsrGI*, sendo a restrição analisada numa electroforese em gel de agarose (figura 3.3). Esta análise permite observar de uma forma qualitativa se o plasmídeo tem o tamanho suposto, o que permite inferir sobre a ocorrência de problemas durante a sua produção com por exemplo a ocorrência de recombinações. No caso de um plasmídeo que resulte de uma reacção de ligação, além da produção, indica se a própria ligação correu como previsto. Por fim, também permite saber se as sequências reconhecidas pela enzima de restrição se encontram presentes.

Na figura 3.3 observam-se as 3 bandas no poço 2 onde ocorreu a restrição. Estas possuem os tamanhos que correspondem aos fragmentos do plasmídeo após a restrição com o tamanho esperado (Anexo IV), o que indica que todos locais de restrição da enzima *BsrGI* se encontram presentes e que não ocorreu nenhuma alteração ao tamanho do plasmídeo durante a sua produção.

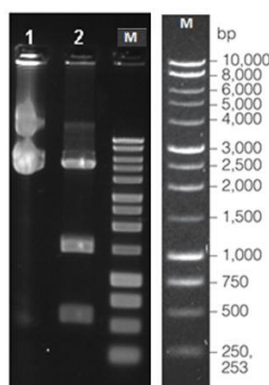


Figura 3.3: Electroforese em gel de agarose (1%) da restrição do plasmídeo pSELECTGFPZeo-LacZ. 1- pSELECTGFPZeo-LacZ.. 2- pSELECT-GFPzeo-LacZ + *BsrGI*. M- Marcador.

3.3. Estudos de transfecção

Foram testados dois métodos químicos de transfecção: a transfecção com fosfato de cálcio e com polietilenamina (PEI). Estes métodos baseiam-se em interações químicas entre as moléculas de DNA e os compostos utilizados, o que irá fazer com que a carga dos complexos formados tenda a ser neutra, facilitando assim a passagem do material genético através da membrana celular.

Estes estudos de transfecção tiveram como objectivo determinar qual o método que confere uma maior eficiência de transfecção com a menor concentração de plasmídeo uma vez que para o futuro funcionamento do sistema de recombinação de troca de *cassette* é requerido que exista apenas uma cópia da *cassette* de expressão, ou seja que exista apenas uma cópia das sequências LoxP heterospecíficas incompatíveis no genoma celular. Assim em ambos os estudos foram testadas três quantidades de plasmídeo: 2 µg, 4 µg e 6 µg.

A análise efectuada aos resultados obtidos foi baseada em fotografias de microscopia de fluorescência que permitiram avaliar de uma forma relativa a quantidade de células fluorescentes em cada ensaio.

Nas figuras 3.4 e 3.5 observa-se que para ambos os métodos, nos ensaios em que se utilizou 2 µg e 6 µg de plasmídeo obteve-se mais de 50% de células fluorescentes. No entanto, comparando os dois métodos, é possível observar que nos ensaios do fosfato de cálcio se obtém mais células fluorescentes que nos ensaios com PEI, sendo assim o primeiro método o que apresenta uma maior eficiência de transfecção para as quantidades de DNA referidas.

Na transfecção realizada com o PEI, observa-se um aumento do número de células fluorescentes à medida que a quantidade de plasmídeo utilizada aumenta. Ao contrário deste último, observa-se em todos os ensaios da transfecção com fosfato de cálcio grandes espaços vazios em vez da monocamada celular que se observava antes da transfecção. Estes espaços vazios na monocamada celular podem dever-se à toxicidade do peróxido de hidrogénio formado após a exposição do *HEPES-buffered saline solution* (solução utilizada na transfecção com fosfato de cálcio) à luz ambiente ⁹⁰.

No ensaio de transfecção com 4 µg de plasmídeo, para ambas as células 293# gp11 e 293#3 gp22, os níveis de toxicidade parecem ter sido mais elevados, não existindo no entanto dados que a relacionem com as poucas células viáveis aderentes nestes ensaios. Sabendo que: i) quanto maior o tempo de incubação da solução de transfecção, maior serão os tamanhos dos complexos de DNA formados; ii) quanto maior o tamanho dos complexos de DNA, mais tóxicos estes serão para as células; uma possível justificação para a maior toxicidade nos ensaios com 4ug de DNA é a de que esta poderá dever-se à formação de complexos de maior tamanho devido a um ligeiro aumento do período de incubação da solução de transfecção.

Apesar da possível toxicidade, a transfecção com o fosfato de cálcio utilizando 2 µg/ml de plasmídeo foram o método e a concentração de DNA escolhidos, respectivamente, para serem utilizados na transfecção das células com os plasmídeos construídos e produzidos neste trabalho.

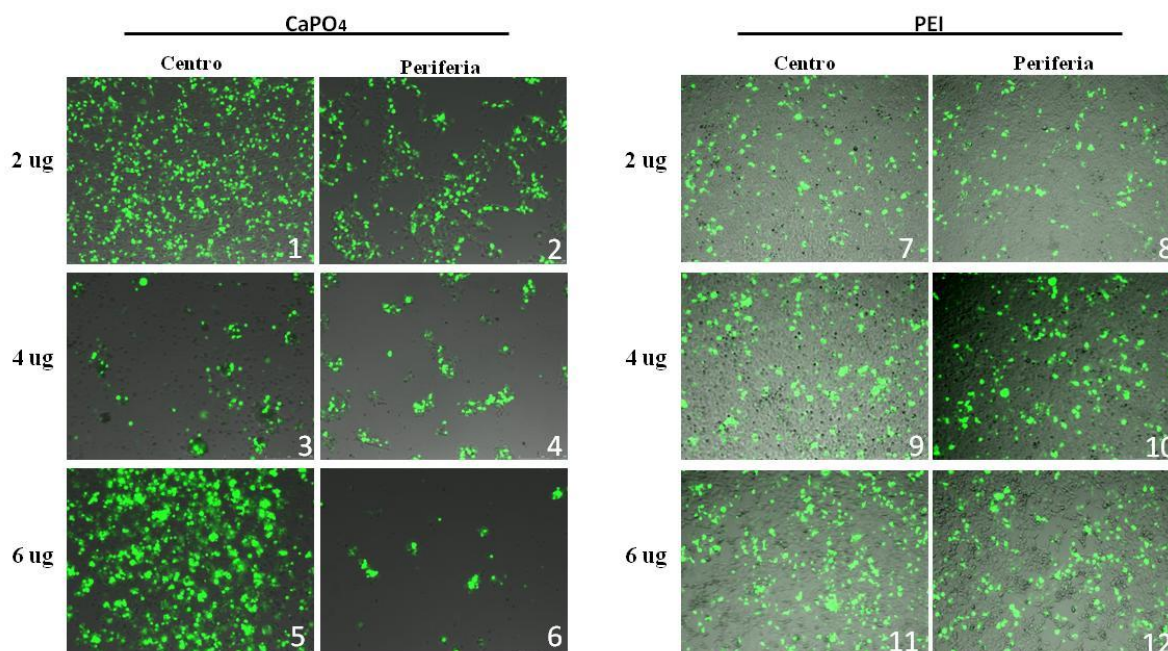


Figura 3.4: Células 293#3 gp11 71 horas após a transfecção com o plasmídeo pSELECTGFPZeo-LacZ. Fotografias do centro e periferia do poço. Ampliação de 50x.

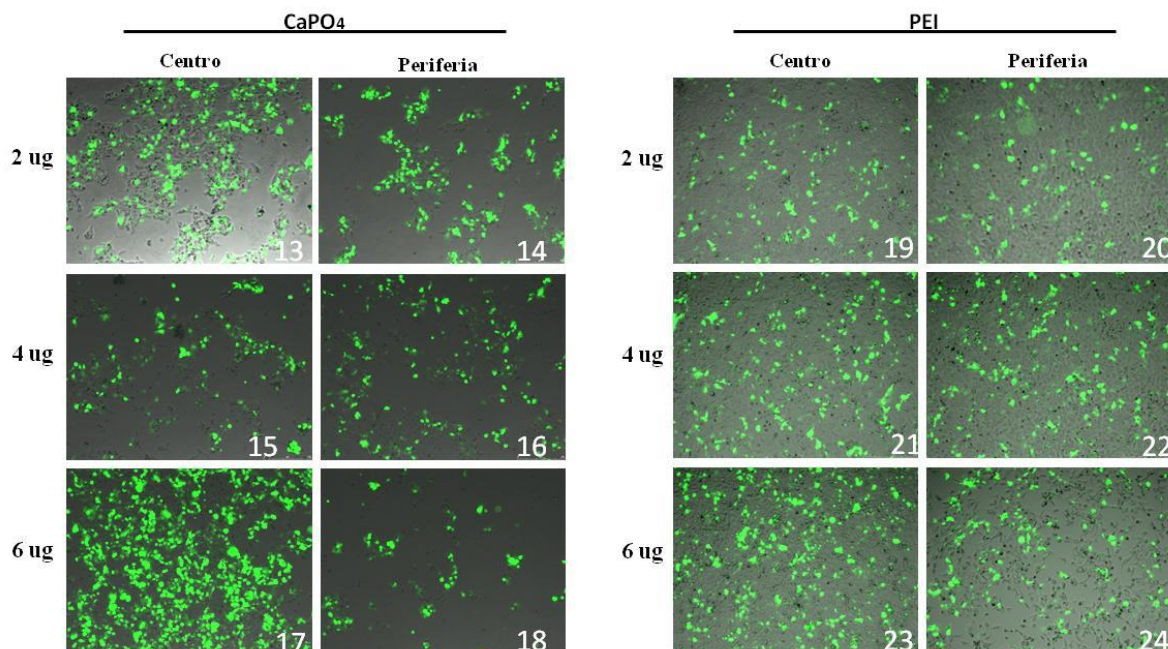


Figura 3.5: Células 293#3 gp22 71 horas após a transfecção com o plasmídeo pSELECTGFPZeo-LacZ. Fotografias do centro e periferia do poço. Ampliação de 50x.

3.4. Desenvolvimento das linhas celulares produtoras de vectores retrovirais com diferentes tropismos

Nesta parte do trabalho foram construídos vectores de expressão com os diferentes genes *env*. Todas as sequências com os diferentes genes *env* foram inseridas no

plasmídeo pMONO-zeo-mcs, sendo assim a transcrição destes genes regulada pela mesma região promotora. Após a sua construção e produção, as células foram transfectadas com os plasmídeos, sendo posteriormente seleccionadas e isoladas. No final obtiveram-se clones produtores de vectores retrovirais

3.4.1. Produção dos plasmídeos pMONO-zeo-mcs, pENVA, pVPack-10A1, phGalV10A1

Tal como anteriormente, após a produção dos plasmídeos, realizou-se uma reacção de restrição dos mesmos com as respectivas enzimas de restrição, sendo a restrição posteriormente analisada numa electroforese em gel de agarose. Na figura 3.6 verifica-se que todos os plasmídeos produzidos possuem o tamanho esperado (Anexos IV, V, VI e VII), apesar de a enzima *Clal* não ter efectuado um corte nas restrições com os plasmídeos phGalV10A1 e pVPack-10A1. Existem várias hipóteses para a ausência de restrição: i) a enzima pode não estar funcional; ii) a sequência reconhecida pela enzima não se encontra presente ou foi alterada; iii) a sequência reconhecida pela enzima sofreu metilação Dam durante a sua produção, por parte das bactérias, bloqueando a acção da enzima.

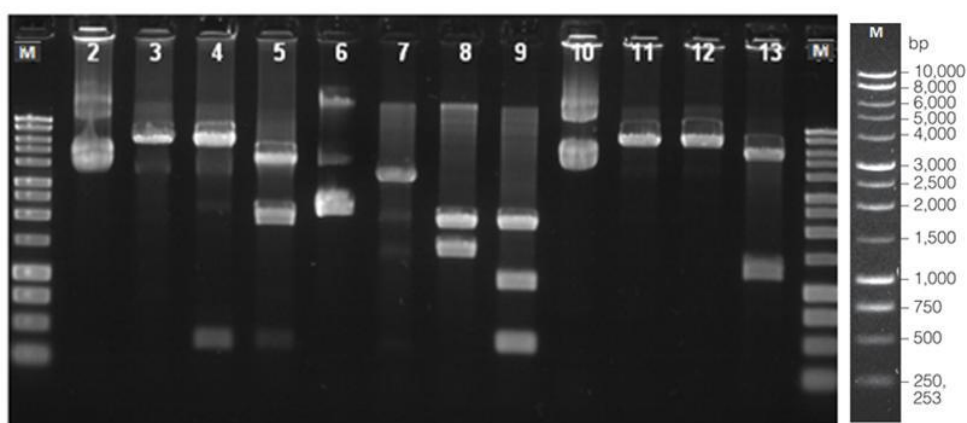


Figura 3.6: Electroforese em gel de agarose (1%) da restrição dos plasmídeos phGalV10A1, pMONO-zeo-mcs e pVPack-10A1. M- Marcador; 2- phGalV10A1; 3- phGalV10A1 + *Clal*; 4- phGalV10A1 + *EcoRI*; 5- phGalV10A1 + *Clal* + *EcoRI*; 6- pMONO-zeo-mcs; 7- pMONO-zeo-mcs + *BamHI*; 8- pMONO-zeo-mcs + *HindIII*; 9- pMONO-zeo-mcs + *BamHI* + *HindIII*; 10- pVPack-10A1; 11- pVPack-10A1 + *Clal*; 12- pVPack-10A1 + *EcoRI*; 13- pVPack-10A1 + *Clal* + *EcoRI*.

A restrição do plasmídeo pENVA foi efectuada e analisada de forma idêntica às anteriores verificando-se que o número e o tamanho dos fragmentos obtidos correspondiam ao esperado (dados não apresentados).

3.4.2. Amplificação das sequências com os genes *env Galv10A1*, *4070A* e *10A1*

As sequências com os genes *env Galv10A1*, *4070A* e *10A1* foram amplificadas a partir dos plasmídeos phGalV10A1, pENVA e pVPack-10A1, respectivamente. O resultado das amplificações foi analisado numa electroforese em gel de agarose como se observa na figura 3.7. Como a temperatura a que ocorre o emparelhamento entre os *primer's* e a sequência alvo durante o PCR influencia directamente a especificidade e o rendimento deste acontecimento, foram realizadas reacções com várias temperaturas de

emparelhamento, com o objectivo de determinar qual a temperatura mais propícia a evitar a produção de produtos de amplificação indesejados.

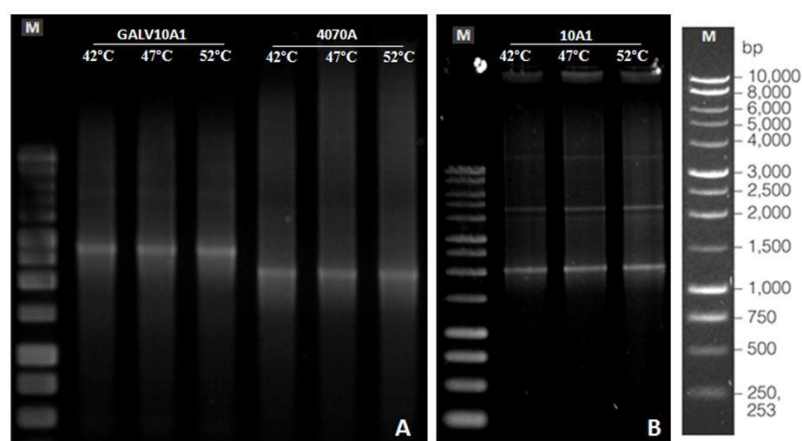


Figura 3.7: Electroforese em géis de agarose (1%) para as várias reacções de PCR realizadas para amplificar as sequências com os respectivos genes *env*. A – Marcador (M), PCR para o gene *GALV10A1* a 42°C, 47°C e 52°C respectivamente, PCR para o gene *4070A* a 42°C, 47°C e 52°C respectivamente. B – Marcador (M), PCR para o gene *10A1* a 42°C, 47°C e 52°C respectivamente.

Na figura 3.7 observa-se que para as sequências com os genes *env Galv10A1* e *4070A*, qualquer uma das temperaturas utilizadas produziu apenas um produto de amplificação cujo tamanho corresponde ao produto desejado (Anexo IX e VII). Assim, para a construção dos plasmídeos pMonoZeo-Galv10A1 e pMonoZeo-4070A, poderá utilizar-se um amplicão proveniente de qualquer reacção efectuada. Foi utilizado o amplicão da reacção efectuada a 47°C.

No gel realizado para a sequência com o gene *10A1*, verifica-se que para todas as temperaturas, além da banda correspondente ao produto desejado (2052 bp), também se observa uma banda com um tamanho na ordem dos 4500 bp e outra banda muito ténue com um tamanho superior aos 10000 bp. Estas duas últimas em princípio não deverão ser produtos de amplificação, pois não foi dado tempo de extensão suficiente à polimerase para produzir bandas de tais tamanhos. Além disso, o facto de estas duas bandas apresentarem uma intensidade semelhante nas três reacções realizadas reforça esta hipótese, pois se resultassem de um emparelhamento inespecífico dos *primer's* deveria observar-se uma menor intensidade das bandas para as reacções com as temperaturas de emparelhamento mais elevadas. O plasmídeo pVPack-10A1 possui 6762 bp, pelo que a banda na ordem dos 4500 bp poderá ser o plasmídeo na sua forma super-enrolada. Por sua vez a banda com um tamanho superior a 10000 bp poderá ser o plasmídeo numa conformação circular.

Assumindo que as bandas de maior tamanho são o plasmídeo pHGalV10A1, verifica-se que nas várias reacções com diferentes temperaturas não ocorreram amplificações inespecíficas. Assim, tal como nos casos anteriores, poderá utilizar-se um amplicão proveniente de qualquer reacção efectuada. Foi utilizado o amplicão da reacção efectuada a 47°C.

3.4.3. Construção dos vectores de expressão pMonoZeo-Galv10A1, pMonoZeo-4070A e pMonoZeo-10A1

Para a construção dos vectores de expressão, foram efectuadas reacções de restrição das sequências amplificadas e do plasmídeo pMONO-zeo-mcs. Após a restrição, as extremidades 5' deste último sofrem ainda uma desfosforilação promovida por uma fosfatase de modo a evitar a religação do mesmo sem a inserção das sequências amplificadas aquando a reacção de ligação. Esta reacção de ligação é promovida por uma *T4 ligase*, sendo este o último passo para a construção dos vectores de expressão.

De modo a confirmar a correcta construção de cada vector de expressão, após as suas produções foi realizada uma reacção de restrição, sendo esta analisada por electroforese num gel de agarose (figura 3.8).

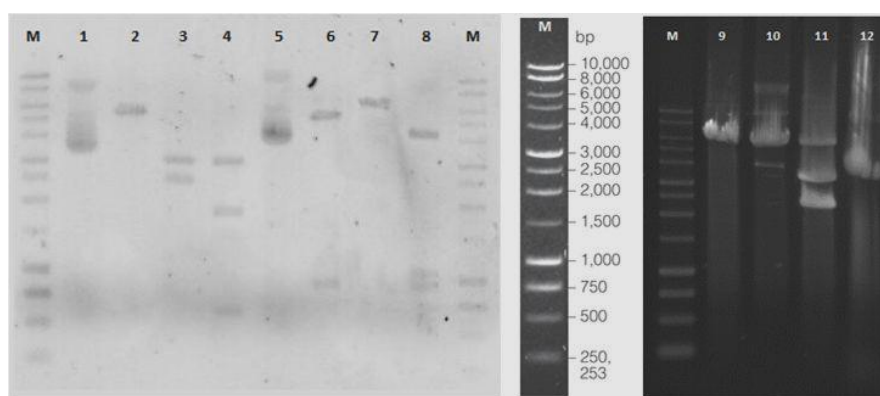


Figura 3.8: Restrição dos vectores de expressão: pMonoZeo-10A1, pMonoZeo-Galv10A1 e pMonoZeo-4070A. M- marcador; 1- pMonoZeo-10A1; 2- pMonoZeo-10A1+*Bam*HI; 3- pMonoZeo-10A1+*Bst*XI; 4- pMonoZeo-10A1+*Bam*HI+*Bst*XI; 5- pMonoZeo-Galv10A1; 6- pMonoZeo-Galv10A1+*Bsp*el; 7- pMonoZeo-Galv10A1+*Bam*HI; 8- pMonoZeo-Galv10A1+*Bsp*el+*Bam*HI; 9- pMonoZeo-4070A+*Age*I; 10- pMonoZeo-4070A+*Avr*II; 11- pMonoZeo-4070A+*Age*I+*Avr*II; 12- pMonoZeo-4070A.

Na figura 3.8, verifica-se que as restrições originaram o número de bandas com o tamanho esperado (Anexos VIII e IX). Apenas na restrição correspondente ao poço 11, apareceram três bandas onde era suposto aparecer apenas as duas bandas de menor tamanho. A banda de maior tamanho corresponde ao tamanho do plasmídeo, pelo que se pode inferir que esta última resultou da restrição parcial do plasmídeo por parte de uma das enzimas.

3.4.4. Titulação das partículas virais resultantes da expressão transiente dos genes *env*

Estando as condições de transfecção estabelecidas e os vectores de expressão produzidos, procedeu-se à transfecção das células 293#3 gp11 e 293#3 gp22. Aproximadamente 16 horas após a transfecção, o meio de cultura foi trocado por meio fresco e 24 horas depois o sobrenadante foi recolhido, filtrado e guardado a -80°C para se determinar a existência de partículas virais infecciosas (Tabela 3.1). As células foram transferidas para novos poços numa diluição de 1:2 em meio fresco com antibiótico, iniciando-se assim o processo de pressão selectiva.

Tabela 3.1: Títulos virais produzidos 40 horas após a transfecção das células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 com os vectores de expressão pMono-Zeo-10A1, pMono-Zeo-4070A e pMono-zeo-GALV10A1. O erro apresentado corresponde ao desvio padrão (n=3).

Células	Títulos virais (p.i./ml)
293#3 gp11 10A1	$7,63 \times 10^3 \pm 1,87 \times 10^3$
293#3 gp22 10A1	$1,2 \times 10^2 \pm 8,49 \times 10^1$
293#3 gp11 Galv10A1	0
293#3 gp22 Galv10A1	0
293#3 gp11 4070A	$9,1 \times 10^4 \pm 1,14 \times 10^5$
293#3 gp22 4070A	$4,98 \times 10^4 \pm 7,55 \times 10^3$

A titulação dos sobrenadantes revelou a produção de partículas infecciosas para as células transfectadas com os vectores de expressão pMono-Zeo-10A1 e pMono-Zeo-4070A, não se verificando título viral para a transfecção realizada com o pMono-Zeo-GALV10A1 em ambas as células 11 e 22. Uma vez que as transfecções foram realizadas ao mesmo tempo e que as condições utilizadas foram as mesmas para os três plasmídeos, estes dados indicam que os dois primeiros referidos estão funcionais, ou seja que os genes *10A1* e *4070A* estão a ser expressos ao contrário do gene *Galv10A1*.

A zona que regula a expressão dos genes *env* é a mesma para todos os vectores de expressão, o que juntamente com os resultados permite concluir que esta é funcional. A análise das construções realizadas através da electroforese em gel de agarose apenas fornece informação relativa ao tamanho dos fragmentos formados durante a restrição, não sendo possível observar pequenas alterações que ocorrem nestes. Assim, uma hipótese para tentar explicar a ausência de partículas virais infecciosas no sobrenadante das células transfectadas com o plasmídeo pMono-zeo-Galv10A1 é a de que pode ter ocorrido alguma mutação durante a construção e ou produção do plasmídeo na região reguladora da expressão do gene ou na própria sequência do gene, o que impedirá a sua correcta transcrição ou tradução.

Mais tarde, verificou-se que embora poucas, algumas células transfectadas com o plasmídeo pMono-zeo-GALV10A1 resistiram à pressão selectiva, chegando mesmo a multiplicar-se. Este novo dado poderá indicar que está a ocorrer a transcrição da sequência com o gene *Galv10A1*, pois este gene faz parte do mesmo mRNA que o gene de resistência ao antibiótico zeocina, estando estes separados por uma sequência IRES. Assim poderá supor-se que se ocorreu uma mutação que impeça a expressão correcta das proteínas GALV10A1, esta terá ocorrido na zona codificante do gene *env* e não na região reguladora da transcrição, pois apesar de fazerem parte do mesmo mRNA, o gene *env* e o gene de resistência ao antibiótico possuem regiões de início de tradução independentes. A tradução do gene *env* é iniciada na região 5' UTR que se encontra a jusante do promotor do gene em questão, enquanto que a tradução do gene de resistência ao antibiótico é iniciada através de uma região IRES que se encontra a jusante do gene *env* (Anexo IX). No entanto não existem dados suficientes para confirmar o proposto ou simplesmente determinar a causa do sucedido, pelo que só se poderia confirmar a existência de uma mutação realizando

análises adicionais, como por exemplo a sequenciação da região onde se encontra o gene *Galv10A1*.

3.4.5. Obtenção de clones e titulação das suas partículas virais infecciosas

Após 3 semanas sobre pressão selectiva, observou-se a formação de colónias a partir das poucas células que sobreviveram à acção do antibiótico. Ao multiplicarem-se, irão apenas sobreviver as células em que ocorreu a integração do vector de expressão no genoma celular.

De uma forma geral, a cada colónia corresponde um clone. Espera-se obter vários clones com diferentes valores de expressão dos genes *env* e consequentemente com diferentes produtividades virais pois como já referido, a expressão dos genes *env* destes irá depender do número de cópias e do local onde os vectores de expressão se inserirem no genoma celular.

Quando se obtiveram células em número suficiente procedeu-se ao isolamento de clones realizando um *limiting dilution* para cada população de células com inserção dos genes *env*. Este processo consiste em isolar uma célula por poço de modo a que esta se replique de modo a amplifica cada clone. Este processo é bastante moroso, durando aproximadamente dois meses. Posteriormente efectuou-se um rastreio dos clones obtidos através da titulação das partículas virais infecciosas produzidas por estes num período de 24 horas (Anexo XI, XII e XIII).

Tabela 3.2: Número de clones obtidos após a pressão selectiva e valores máximos de produtividade viral registados. O erro apresentado corresponde ao desvio padrão (n=3).

Células	Nº de clones	Produtividade viral (p.i./10 ⁶ células.dia)
293#3 gp11 10A1	6	57,2 ± 96,2
293#3 gp22 10A1	12	142,8 ± 116,5
293#3 gp11 4070A	37	512,8 ± 514,6
293#3 gp22 4070A	31	24046,9 ± 525,1

Os resultados obtidos demonstram que foram desenvolvidos clones produtores de vectores retrovirais, apesar das produtividades virais obtidas para este rastreio terem sido mais baixas que o esperado.

À excepção dos clones 293# gp22 4070A, onde se registou uma diferença de 1000x nas produtividades virais obtidas, todos os outros clones apresentam pouca heterogeneidade nos valores de produtividade viral registados (Anexo XII e XIII). As diferenças de valores de produtividade viral traduzem-se em diferenças de expressão dos genes *env*, podendo estas últimas dever-se principalmente a dois factores: os locais do genoma celular onde a *cassette* de expressão se integrou e o número de cópias integradas no genoma celular. Por sua vez, a pouca variedade e os baixos valores de produtividades virais poderão dever-se à diminuta heterogeneidade dos clones obtidos (que pode ter origem numa baixa taxa de transfecção) após a pressão selectiva, uma vez que se observou a formação de um pequeno número de

colónias após este processo de selecção, e talvez ao valor insuficiente de expressão do gene *env* conferido pela região promotora da *cassette* de expressão, respectivamente.

Outro facto interessante é a diferença dos valores de produtividades virais para as células transfectadas com o plasmídeo pMono-Zeo-4070A, sendo estes de uma maneira geral mais elevados para os clones derivados das células 293# gp22. Esta diferença entre as células 293#3 gp11 e as células 293#3 gp22 parece ir ao encontro da hipótese já mencionada anteriormente, relativa às diferenças de expressão de *gag-pro-pol* entre as duas células e a dificuldade de produção de partículas virais infecciosas, caso o gene *env* não possua uma expressão suficientemente elevada. No entanto não existem dados suficientes para afirmar que a hipótese referida sustenta os dados obtidos existindo outra hipótese como por exemplo o facto de todos os clones 293#3 gp11 isolados possuírem uma baixa expressão dos genes *env* relativamente aos clones 293#3 gp22.

Por fim, seria de esperar que os títulos obtidos para os sobrenadantes das populações recolhidos aproximadamente 40 horas após as transfecções (tabela 3.1), fossem significativamente mais baixos que os títulos mais elevados obtidos no rastreio individual dos clones (tabela 3.2), mas tal facto não se verificou. Uma justificação para o sucedido será a de que possivelmente aquando a recolha do sobrenadante das populações, existiam muitas células com um ou mais plasmídeos no seu interior sob a forma episomal (devido à proximidade do evento de transfecção) o que permitiu a expressão do gene *env* a partir de um grande número de plasmídeos e células. Esta justificação também poderá explicar o facto de não se ter observado diferenças nos títulos virais das populações para ambos os genes *env* entre as células 293#3 gp11 e as células 293-3 gp22, pois desta forma a expressão dos genes *env* não pode ser condicionada por factores inerentes ao genoma celular. Posteriormente, em muitos destas células poderá não ter ocorrido a integração dos vectores de expressão no seu genoma celular acabando-o por “perder”, ou então poderá ter ficado integrado numa região do genoma celular que não permita uma expressão significativa do gene *env*. A ideia anterior também fornece uma hipótese para o facto de se terem originado tão poucas colónias durante o processo de pressão selectiva.

3.4.6. Caracterização de clones (determinação das taxas específica máxima de crescimento e das produtividade virais)

Após o rastreio inicial dos clones obtidos, foram escolhidos os três clones 293#3 gp22 4070A que apresentavam uma maior produtividade viral para se determinar as suas taxas específicas máximas de crescimento e as produtividades virais. Assim para cada um foram efectuados estudos de crescimento em sistema estático utilizando *T-Flask's* com uma área de 25 cm².

Como se pode observar na figura 3.9, para todas as células verifica-se um padrão de crescimento semelhante, o que está em concordância com os valores de densidade celular

máxima e taxa específica de crescimento máxima determinados (tabela 3.2), não existindo diferenças significativas entre estes.

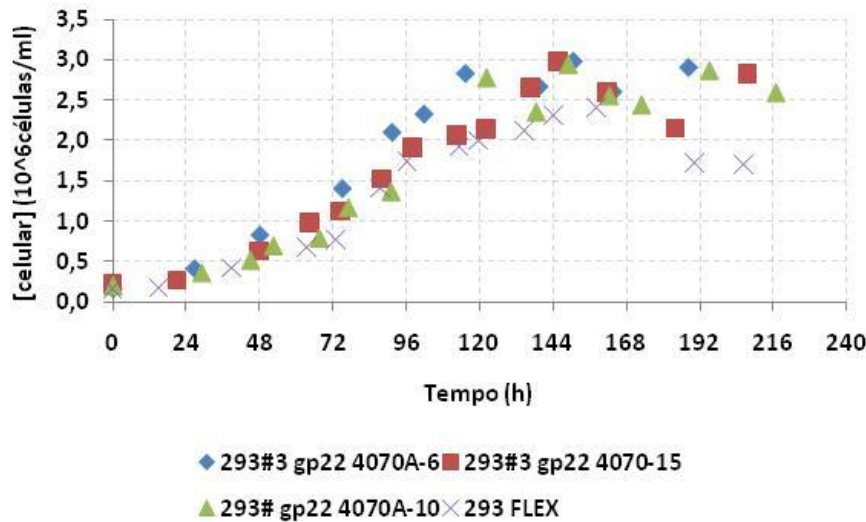


Figura 3.9: Estudo de crescimento das células 293 FLEX e do clones 293#3 gp22 4070 6, 10 e 15.

Tabela 3.2: Taxa específica máxima de crescimento para as células 293 FLEX e do clones 293#3 gp22 4070 6, 10 e 15.

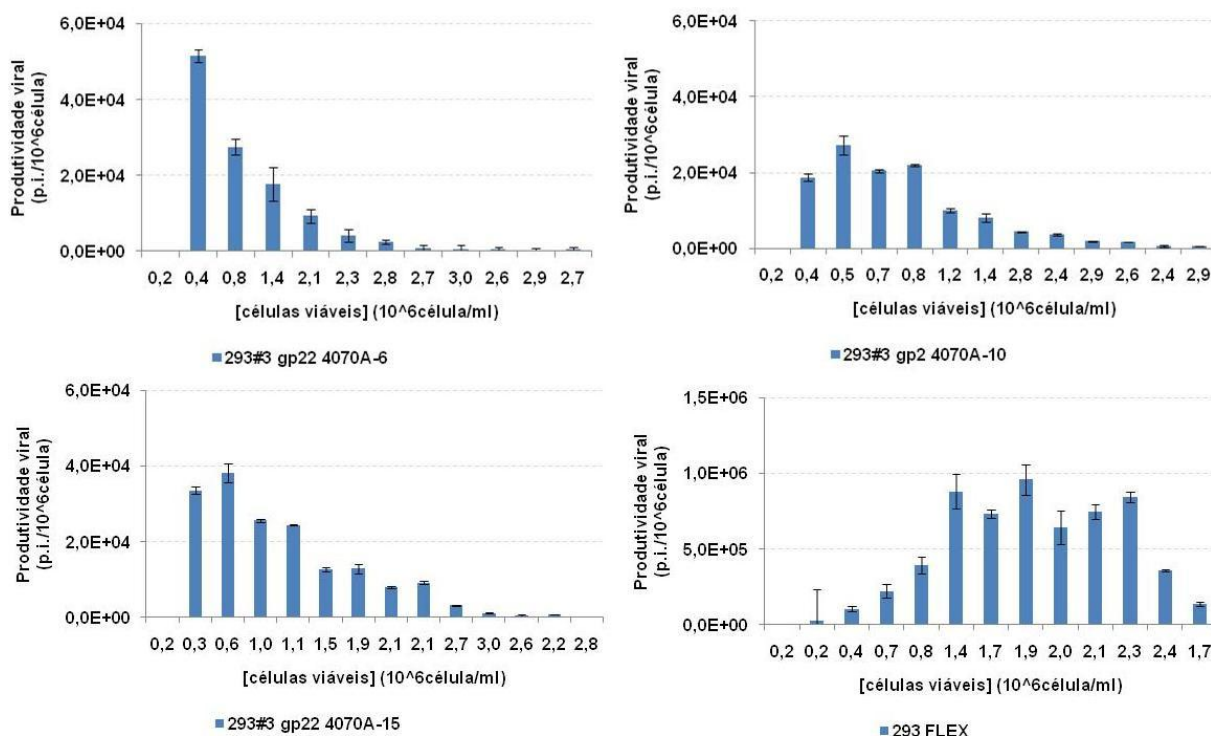
	Taxa específica de crescimento máxima (h ⁻¹)	Densidade celular máxima (10 ⁶ células/ml)
293#3 gp 224070A-6	0,0019 ± 0,00039	2,9 ± 0,50
293#3 gp 224070A-10	0,0029 ± 0,00047	2,9 ± 0,088
293#3 gp 22407A-15	0,0026 ± 0,00017	2,8 ± 0,028
293 FLEX	0,0037 ± 0,00066	2,4 ± 0,48

Em relação aos valores máximos de produtividade viral (tabela 3.3), verifica-se de facto que os clones produzidos possuem uma produtividade viral inferior à das células 293 FLEX. Para esta diferença podem contribuir vários factores tais como: i) a diferença de proteínas Env entre as células 293#3 gp22 4070A e as 293 FLEX uma vez estas interagem respectivamente com os receptores celulares Ram-1 e Galvr-1; ii) a diferença estrutural entre as *cassettes* de expressão com o gene *env* das células 293#3 gp22 4070A e as 293 FLEX, pois a região promotora das *cassettes* é diferente iii) o número de *cassettes* de expressão com os genes *gag-pro-pol* integradas no genoma e a influência na sua expressão provocada pelos locais onde estas se integraram.

Além da diferença entre os valores máximos de produtividade viral, verifica-se ainda que os perfis de produtividade ao longo do crescimento celular (figura 3.10) são diferentes entre os clones 293#3 4070A e as células 293#3 FLEX. Para os clones 293#3 4070A o perfil de produtividade ao longo do crescimento celular é muito semelhante, atingindo o máximo de produtividade ainda no início da fase exponencial. Para as células 293 FLEX o máximo de produtividade foi atingido aproximadamente a meio da fase exponencial continuando com produtividades elevadas ainda na fase estacionária.

Tabela 3.3: Valores máximos de produtividade viral para células 293 FLEX e do clones 293#3 gp22 4070 6, 10 e 15.

	Produtividade viral (p.i./10 ⁶ célula)
293#3 gp 224070A-6	$5,1 \times 10^4 \pm 5,1 \times 10^4$
293#3 gp 224070A-10	$2,7 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^1$
293#3 gp 22407A-15	$3,8 \times 10^4 \pm 7,7 \times 10^3$
293 FLEX	$6,2 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$

**Figura 3.10:** Perfis da concentração de partículas infecciosas em função da concentração celular para as células 293 FLEX e do clones 293#3 gp22 4070 6, 10 e 15.

3.4.7. Titulação das partículas virais resultantes da expressão transiente do novo vector de expressão pMono-Zeo-Galv10A1

De modo a comprovar que a inexistência de partículas virais infecciosas na transfecção realizada anteriormente com o pMono-Zo-Galv10a1 se deve há ocorrência de algum erro ou mutação durante a sua construção e ou produção, foi realizado uma nova transfecção com o mesmo plasmídeo e com o plasmídeo de onde a sequência com o gene Galv10A1 foi amplificada, o pHaLV10A1.

As titulações dos sobrenadantes resultantes das transfecções, recolhidos 48h após as mesmas, mostraram mais uma vez a inexistência de partículas virais infecciosas para a transfecção com o pMono-Zo-Galv10A1. Ao contrário deste, a transfecção com o pHaLV10A1 deu a origem a títulos virais na ordem das 10⁴ p.i./ml para ambas as células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 (dados não apresentados), confirmando-se assim a não funcionalidade do plasmídeo pMono-Zeo-galv10A1 construído.

Paralelamente ao trabalho realizado anteriormente, foi produzido um novo vector de expressão pMono-zeo-Galv10A1, repetindo todos os processos e utilizando as mesmas metodologias, desde a amplificação da sequência com o gene 10A1 até à transfecção do novo plasmídeo. Os resultados das titulações dos sobrenadantes recolhidos 40 horas após a transfecção das células com este novo plasmídeo são positivos (tabela 3.3), indicando que neste novo pMono-Zeo-Galv10A1 ocorre a expressão do gene *env*, permitindo assim a produção de partículas infecciosas.

Tabela 3.3: Títulos virais produzidos 40 horas após a transfecção das células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 com a nova construção pMono-zeo Galv10A1. O erro apresentado corresponde ao desvio padrão (n=3).

Células	Títulos virais (p.i./ml)
293#3 gp11 Galv10A1	$8,4 \times 10^3 \pm 0,08 \times 10^3$
293#3 gp22 Galv10A1	$8,2 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$

3.4.8. Perspectivas futuras

Uma vez verificado a funcionalidade dos plasmídeos construídos, que as metodologias utilizadas e as condições estabelecidas permitem a obtenção de células produtoras de partículas virais infecciosas, os principais objectivos a alcançar no futuro são a obtenção de clones com os genes *env GalV10A1* e *10A1* e novos clones com o gene *env 4070A* de modo a ser possível determinar se as baixas produtividades virais obtidas para os clones produzidos neste trabalho se devem simplesmente às influências do local do genoma celular onde a *cassette* de expressão com o gene *env* se integrou ou se é a própria estrutura da *cassette* que não permite níveis suficientes de expressão do gene *env 4070A*, estando assim a limitar o número de partículas virais infecciosas produzidas. Posteriormente, quando se produzirem clones com maiores produtividades virais pretende-se determinar qual o valor de expressão das glicoproteínas Env e o número de cópias deste inserido no genoma celular com o intuito de se estabelecer as linhas celulares produtoras de vectores retrovirais.

3.5. Desenvolvimento da linha celular produtora de vectores retrovirais com o sistema de recombinação de troca de *cassette* para o gene *env*

Nesta parte do trabalho foi construído o vector de expressão com o gene *env 4070A* integrado sistema de recombinação de troca de *cassette* (pTagLoxP-4070A). Após a sua produção pretende-se confirmar a sua funcionalidade em relação à expressão do gene *env 4070A*, transfectando as células 293# gp11 e 293#3 gp 22

3.5.1. Produção do plasmídeo pTagLoxP-mcs

Este plasmídeo foi produzido da mesma forma que os anteriores, tendo sido realizado uma reacção de restrição sendo esta analisada numa electroforese em gel de agarose (1%), para verificar o tamanho do plasmídeo (figura 3.11).

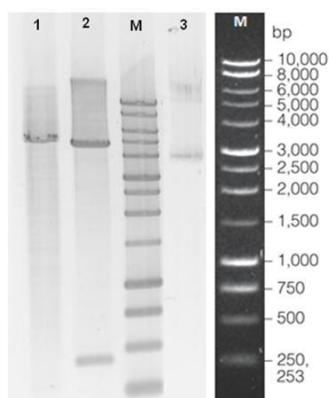


Figura 3.11: Restrição do plasmídeo pTagLoxP-mcs. 1- pTagLoxP-mcs + *Bstx I*; 2- pTagLoxP-mcs *Nde I*; 3- pTagLoxP-mcs M;- marcador.

Como se pode observar na figura 3.11, o tamanho dos fragmentos de restrição obtidos pelas enzimas *Bstx I* e *Nde I* possuem um tamanho correspondente ao previsto (Anexo X), podendo utilizar-se este plasmídeo para avançar com a construção do vector de expressão com o gene *4070A* integrado no sistema de recombinação de troca de *cassette*.

3.5.2. Amplificação da sequência com o gene *env 4070A*

Neste caso, não se pode inserir no plasmídeo pTagLoxP-mcs a sequência com o gene *env 4070A* já amplificada anteriormente uma vez que a enzima de restrição *Avr II* utilizada para formar uma das suas extremidades coesivas também efectua um corte no interior do plasmídeo pTagLoxP-mcs (a montante do promotro CMV), além do corte no mcs (do inglês, *multiple cloning site*) onde se pretende inserir o gene *env 4070A* (Anexo X). Assim foi necessário “desenhar” um novo *primer reverse* e realizar uma nova amplificação da sequência com o gene *4070A*. Este novo *primer reverse* é muito semelhante ao anterior já utilizado, sendo a única modificação a troca da sequência reconhecida pela enzima *Avr II* pela sequência reconhecida pela enzima *Sph I* na extremidade do *primer*.

Para amplificar a sequência, tal como anteriormente, foram realizadas reacções de PCR com três temperaturas diferentes de emparelhamento (42°C, 47°C e 52°C) dos *primer's* com a sequência alvo (dados não apresentados). Após a análise da amplificação numa electroforese em gel de agarose constatou-se que para todas as temperaturas de emparelhamento dos *primer's* com a sequência alvo utilizada foi produzido apenas um amplicão com um tamanho ente entre as bandas do marcador 2000bp e 2500bp o que corresponde aos 2258bp da sequência a amplificar (Anexo V).

3.5.3. Construção do plasmídeo pTagLoxP-4070A

A construção do plasmídeo pTagLoxP-4070A foi realizada de igual maneira que as anteriores construções, inserindo a sequência amplificada no plasmídeo pTagLoxP-mcs previamente linearizado. Após a construção e produção do plasmídeo pTagLoxP-4070A, foi

novamente realizada uma reacção de restrição sendo esta analisada por electroforese em gel de agarose (figura 3.12).

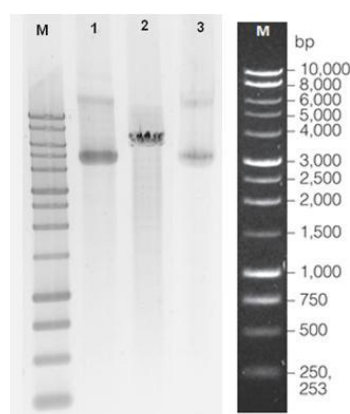


Figura 3.12: Restrição do plasmídeo pTagLoxP-4070A. M- marcador; 1- pTagLoxP-4070A + *Bst**x* I; 2- pTagLoxP-4070A + *Nde* I; 3- pTagLoxP-4071A.

Na figura 3.12 verifica-se que o padrão de bandas existente na reacção com a enzima *Bst**x* I, não está de acordo com previsto (Anexo X) e que este é semelhante ao padrão de bandas existente no poço com o plasmídeo sem restrição o que leva a concluir que a enzima *Bst**x* I não efectuou qualquer corte. As bandas presentes em ambos os poços serão provavelmente o plasmídeo nas suas conformações super-enrolada e circular, sendo esta última a que corresponde à banda de maior tamanho.

Na restrição com a enzima *Nde* I, a banda obtida tem um tamanho que corresponde ao do plasmídeo, o que indica que esta apenas efectuou um corte tal como esperado (Anexo X).

3.5.4. Transfecções e títulos virais

Após a produção do plasmídeo pTagLoxP-4070A, procedeu-se à transfecção das células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 com o mesmo, para verificar a sua funcionalidade em relação à expressão do gene 4070A que se irá traduzir na produção de partículas virais infecciosas, como nos casos anteriores. O método de transfecção utilizado foi o escolhido anteriormente, transfecção com fosfato de cálcio.

Para o futuro funcionamento do sistema de troca é requerido que exista apenas uma cópia das sequências LoxP utilizadas no genoma celular, como já referido. Assim, aquando o processo de transfecção, pretende-se que ocorra a integração de apenas uma cópia do plasmídeo no genoma celular. Com este objectivo, além da quantidade de DNA escolhida anteriormente para se utilizar durante a transfecção (2µg), foram também utilizadas quantidades menores, 1 µg e 0,5 µg.

Após a obtenção de clones das respectivas transfecções, pretende-se realizar uma análise comparativa dos mesmos em relação ao número de cópias do plasmídeo inseridas no genoma celular de modo a determinar se entre as 3 quantidades de DNA utilizadas na transfecção, alguma é mais favorável à obtenção de clones com apenas uma cópia do plasmídeo integrado no genoma celular.

Na tabela 3.4 encontram-se os resultados das titulações dos sobrenadantes recolhidos 23 horas após as transfecções. Verifica-se que em todos os casos, a presença de partículas virais infecciosas, o que confirma a ocorrência de transfecção para as três quantidades de plasmídeo utilizadas e a funcionalidade do plasmídeo pTagLoxp-4070A em relação à expressão do gene 4070A.

Tabela 3.4: Títulos virais produzidos pelas células 293#3 gp22 e 293#3 gp11, 23 horas após a transfecção com o pTagLoxP-4070A. O erro apresentado corresponde ao desvio padrão (n=3).

Células	pTagLoxP-4070 (µg)	Títulos virais (p.i./ml)
293#3 gp11 Cre/LoxP 4070A	0,5	$1 \times 10^2 \pm 1 \times 10^2$
	1	$1,7 \times 10^2 \pm 0,58 \times 10^2$
	2	$23 \times 10^2 \pm 0,58 \times 10^2$
	0,5	$2 \times 10^2 \pm 0$
293#3 gp22 Cre/LoxP 4070A	1	$3,7 \times 10^2 \pm 2,5 \times 10^2$
	2	$2,3 \times 10^2 \pm 2,5 \times 10^2$

3.5.5. Electroporação

Uma vez que o método de transfecção com fosfato de cálcio e o PEI tem como base a formação de complexos entre os compostos utilizados e o DNA, é assim provável que várias cópias do plasmídeo se encontrem no mesmo complexo, o que pode promover a integração de mais de uma cópia do plasmídeo no genoma celular. De modo a tentar evitar a possibilidade de múltiplas integrações, foi também testado o método de transfecção por electroporação com as mesmas quantidades de DNA utilizadas para a transfecção com fosfato de cálcio.

A electroporação consiste na disrupção temporária da integridade estrutural das membranas celulares através de choques eléctricos⁹¹ o que irá promover a passagem de DNA presente no meio extracelular através das membranas lipídicas. Neste método o plasmídeo não se encontra complexado a elementos químicos o que poderá permitir uma distribuição mais homogénea das inúmeras cópias do plasmídeo no meio extracelular e promover assim a passagem de um menor número de cópias do plasmídeo através da membrana plasmática. Se for possível diminuir a quantidade de DNA transfectado por célula, tal como referido, poderá ser assim promovida a integração de apenas uma cópia do plasmídeo no genoma celular.

No futuro, além da comparação entre os clones resultantes das transfecções com fosfato de cálcio com diferentes quantidades de plasmídeo, em relação ao número de cópias deste inseridas no genoma celular, pretende-se realizar a mesma comparação entre os clones obtidos pela transfecção com fosfato de cálcio e electroporação.

Foram realizadas duas electroporações semelhantes. Uma para as células 293#3 gp11 onde se utilizou uma concentração celular inicial de 5×10^7 células/ml e outra para as células 293#3 gp22 onde se utilizou uma concentração celular inicial de 5×10^6 células/ml com o

intuito de determinar qual a melhor a utilizar. Uma vez que ambas as células são muito semelhantes, os resultados de uma serão considerados válidos para ambas.

Foram realizados controlos positivos utilizando o plasmídeo pSELECT-GFPzeo-LacZ (figura 3.13 e 3.14), e como anteriormente, a análise foi efectuada por fotografias de microscopia de fluorescência que permitem avaliar de uma forma relativa a quantidade de células fluorescentes em cada ensaio.

A análise da figura 3.13 demonstra que três dias após a electroporação com a concentração celular de 5×10^6 células/ml, o número de células vivas aderentes é muito pequeno, sabendo empiricamente que este é bem menor que o número de células no inóculo inicial. Estes dados indicam que os choques eléctricos devem provocar uma elevada morte celular, como é descrito na literatura ². Pode ainda observar-se que o número de células fluorescentes é muito diminuto, não se observando diferenças para as três concentrações de plasmídeo utilizadas.

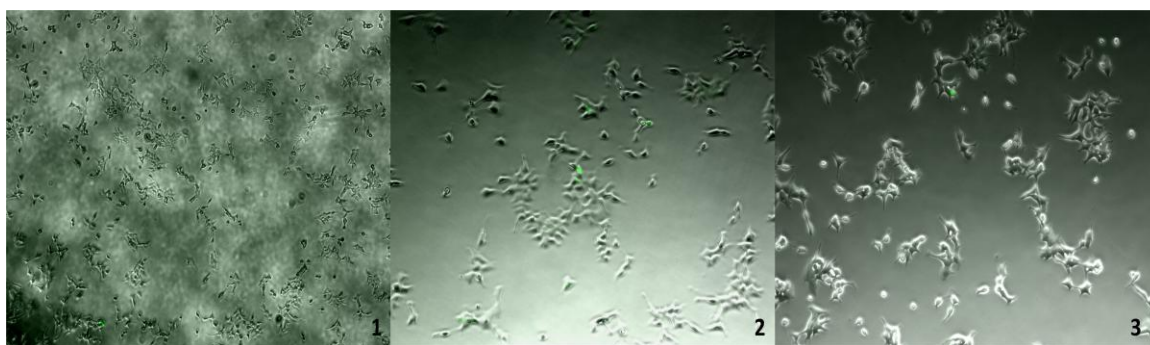


Figura 3.13: Fotografias das células 293#3 gp22, 70 horas após electroporação com o plasmídeo pSELECT-GFPzeo-LacZ. 1- Electroporação com 0,5 µg DNA, ampliação de 50x. 2- Electroporação com 1 µg DNA, ampliação de 100x. 3- Electroporação com 2 µg DNA, ampliação de 100x.

Na electroporação com um inóculo celular inicial de 5×10^7 células/ml (3.14), é notório o elevado número de células vivas aderentes após a electroporação, o que confirma a necessidade de uma elevada concentração celular para que a transfecção através deste método seja eficiente. É também perceptível o aumento do número de células transfectadas com o aumento da concentração de plasmídeo utilizada, tendo-se obtido células fluorescentes para as 3 concentrações de plasmídeo testadas.

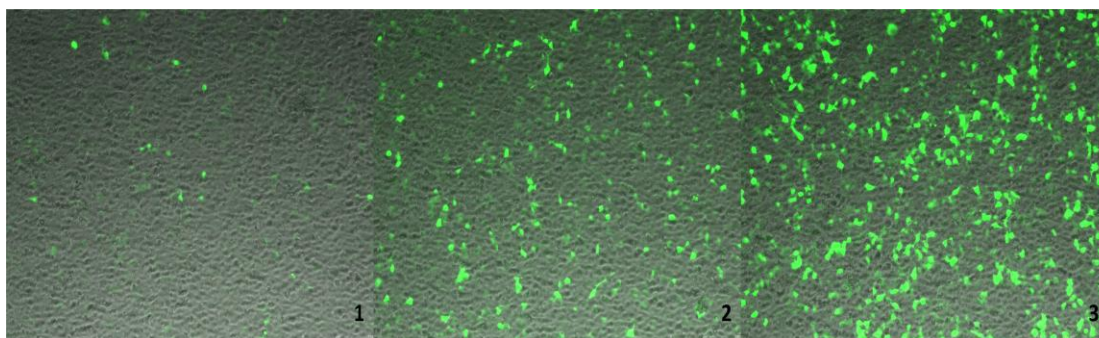


Figura 3.14: Fotografias das células 293#3 gp11, 20 horas após electroporação com o plasmídeo pSELECT-GFPzeo-LacZ. Ampliação de 50x. 1- Electroporação com 0,5 µg DNA. 2- Electroporação com 1 µg DNA. 3- Electroporação com 2 µg DNA.

Comparando os dois ensaios de electroporação, a maior concentração celular utilizada é definitivamente a melhor pois permite uma maior viabilidade celular após a transfecção, além de um elevado número de células fluorescentes.

Em relação a ambos os métodos de transfecção, transfecção com fosfato de cálcio e electroporação, o último é mais eficiente tendo em conta que neste para a mesma quantidade de plasmídeo (2 µg) o número de células fluorescentes é muito maior o que se pode dever à questão do plasmídeo se encontrar distribuído de uma forma mais homogénea na solução.

Os sobrenadantes das electroporações com o plasmídeo pTagLoxP-4070A também foram recolhidos no momento em que se tirou as fotografias aos controlos positivos, para posteriormente ser determinada a quantidade de partículas virais infecciosas, como se observa na tabela 3.5:

Tabela 3.5: Títulos virais produzidos pelas células 293#3 gp22 e 293#3 gp11, 70 horas e 20 horas respectivamente, após a electroporação com o pTagLoxP-4070A. O erro apresentado corresponde ao desvio padrão (n=3).

Células	pTagLoxP-4070 (µg)	Títulos virais (p.i./ml)
293#3 gp11 Cre/LoxP 4070A	0,5	100 ± 152
	1	400 ± 88
	2	500 ± 100
293#3 gp22 Cre/LoxP 4070A	0,5	100 ± 58
	1	167 ± 120
	2	100 ± 58

Apesar da grande diferença de quantidade de células fluorescentes evidenciada nos controlos positivos entre as células 293#3 gp 11 e 293#3 gp22, esta não se verifica entre os respectivos títulos virais obtidos, sendo estes apenas ligeiramente mais elevados para as células 293#3 gp11. Os factores que poderão ter contribuído para os valores diminutos de partículas virais infecciosas registados para as últimas células referidas são o pouco tempo entre a transfecção das células e a recolha do sobrenadante e o possível baixo valor de pH do meio de cultura aquando a recolha do sobrenadante que terá origem na elevada concentração celular e consequente produção de ácido láctico proveniente do metabolismo celular. Estudos efectuados com vectores retrovirais demonstram que o intervalo óptimo de pH para a produção de vectores retrovirais se situa entre os 6,8 e 7,2 ^{92,93} enquanto que estes permanecem estáveis entre os valores de 5,5 e 8 ⁹⁴.

Entre as três transfecções realizadas para as células 293#3 gp11 observa-se uma tendência decrescente de produção de partículas infecciosas com a diminuição de plasmídeo utilizado na transfecção. No entanto, como se pode verificar todos os títulos virais possuem um grande erro associado o que se deve ao baixo título viral obtido. Este foi determinado no limite inferior de sensibilidade do método de titulação viral.

A principal conclusão a retirar é a de que através da electroporação é possível transfectar as células de modo a que produzam partículas virais infecciosas de forma transiente e logo espera-se obter também com este método clones produtores de vectores retrovirais.

3.5.6. Perspectivas futuras

No trabalho futuro a desenvolver, após a obtenção de clones produtores de vectores retrovirais, pretende-se comparar o método e as condições de transfecção que os originou com o número de cópias do plasmídeo pTagLoxP-4070A inseridas no genoma celular das células. Esta comparação tem como o objectivo determinar qual o método de transfecção e a concentração de pTagLoxP-4070A a utilizar de modo a evitar a integração de mais de uma cópia do plasmídeo no genoma celular.

Depois de seleccionado o clone com a maior produtividade viral e apenas uma cópia do plasmídeo pTagLoxP-4070A integrado no genoma celular, pretende-se comprovar a funcionalidade e determinar a eficácia do sistema de recombinação de troca de *cassette* com o objectivo final de estabelecer a linha celular produtora de vectores retrovirais. Esta será flexível, podendo servir de plataforma à produção de vectores retrovirais sem capacidade replicativa com diferentes transgenes e diferentes tropismos.

4. Conclusão

Este trabalho permitiu desenvolver vários plasmídeos e protocolos que contribuem para o avanço do projecto que tem como objectivo o estabelecimento de linhas celulares produtoras de vectores retrovirais com diferentes tropismos. Foram construídos os plasmídeos pMonoZeo-10A1, pMonoZeo-4070A, pMonoZeo-Galv10A1 e pTagLoxP-4070A, tendo-se verificado que estes são funcionais em relação à expressão dos respectivos genes *env*, pois permitiram a produção de partículas infecciosas após a transfecção das células 293#3 gp11 e 293#3 gp22 com os plasmídeos referidos. Foram ainda analisados vários métodos de transfecção e estabelecido o protocolo para transfecções estáveis que não requerem a integração de uma só cópia dos plasmídeos no genoma celular (transfecção com fosfato de cálcio utilizando 2 µg de DNA).

Com o desenvolvimento futuro das linhas celulares utilizando o plasmídeo com o sistema de recombinação de troca de *cassette* pTagLoxP-4070A espera-se contribuir para o avanço do estado da arte no desenvolvimento de linhas celulares produtoras de vectores retrovirais. O sistema de troca de *cassette* presente no pTagLoxP-4070A irá permitir a produção de vectores retrovirais com diferentes tropismos de uma forma mais rápida e eficiente, eliminando o moroso processo de rastreio e selecção de clones.

5. Referências Bibliográficas

1. Verma, I.M. & Weitzman, M.D. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annual Review of Biochemistry* **74**, 711-38(2005).
2. Mountain, A. Gene therapy: the first decade. *Trends in biotechnology* **18**, 119-28(2000).
3. Wolff, J.A. & Lederberg, J. An early history of gene transfer and therapy. *Human Gene Therapy* **5**, 469-480(1994).
4. Gonçalves, M.A.F.V. A concise peer into the background , initial thoughts and practices of human gene therapy. *BioEssays* **27**, 506-517(2005).
5. Roemer, K. & Friedmann, T. Concepts and strategies for human gene therapy. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **208**, 211-25(1992).
6. Graham, F.L. & Der Eb, A.J. van A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-67(1973).
7. Rogers, S. & Pfuderer, P. Use of Viruses as Carriers of Added Genetic Information. *Nature* **219**, 749-751(1968).
8. Wei, C.-M. et al. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* **39**, 935-44(1981).
9. Joyner, A. et al. Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells. *Nature* **305**, 556-8(1983).
10. Williams, D.A. et al. Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature* **310**, 476-80(1984).
11. Wolfe, J.H. et al., Birkenmeier E.H. Reversal of pathology in murine mucopolysaccharidosis type VII by somatic cell gene transfer. *Nature* 749-53(1992).
12. Blaese, R.M. et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science* **270**, 475-480(1995).
13. Kaplan, J.M. et al. Humoral and cellular immune responses of nonhuman primates to long-term repeated lung exposure to Ad2/CFTR-2. *Gene therapy* **3**, 117-27(1996).
14. Chirmule, N. et al. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene therapy* **6**, 1574-83(1999).
15. Edelstein, M.L., Abedi, M.R. & Wixon, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. *Journal of Gene Medicine* **9**, 833-842(2007).
16. Scollay, R. Gene Therapy A Brief Overview of the Past , Present , and Future. *Gene Therapy* 26-30(2000).
17. Gao, G., JM, W. & Batshaw, M., with Raper, S. et al., Bagg Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Molecular Genetics and Metabolism* **80**, 148-158(2003).

18. Hacein-Bey-Abina, S. et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415-9(2003).
19. Hacein-Bey-Abina, S. et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine* **348**, 255-6(2003).
20. Cavazzana-Calvo, M., Thrasher, A. & Mavilio, F. The future of gene therapy. *Nature* **427**, 779-81(2004).
21. Gaspar, H. et al. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *The Lancet* **364**, 2181-2187(2004).
22. Ginn, S.L. et al. Treatment of an infant with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1) by gene therapy in Australia. *The Medical journal of Australia* **182**, 458-63(2005).
23. Moloney, J.B. Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. *Journal of the National Cancer Institute* **24**, 933-51(1960).
24. Coffin, J.M. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Current topics in microbiology and immunology* **176**, 143-64(1992).
25. Overbaugh, J., Miller, A.D. & Eiden, M.V. Receptors and Entry Cofactors for Retroviruses Include Single and Multiple Transmembrane-Spanning Proteins as well as Newly Described Glycophosphatidylinositol-Anchored and Secreted Proteins. *Society* **65**, 371-389(2001).
26. Coffin, J.M., Hughes, S.H. & Varmus, H.E. Retroviruses. (1997).
27. Palù, G. et al. Progress with retroviral gene vectors. *Reviews in medical virology* **10**, 185-202(2000).
28. Opstelten, D.J., Wallin, M. & Garoff, H. Moloney murine leukemia virus envelope protein subunits, gp70 and Pr15E, form a stable disulfide-linked complex. *Journal of virology* **72**, 6537-45(1998).
29. Lavillette, D. et al. Activation of a cell entry pathway common to type C mammalian retroviruses by soluble envelope fragments. *Journal of virology* **74**, 295-304(2000).
30. Pinter, A. et al. Localization of the labile disulfide bond between SU and TM of the murine leukemia virus envelope protein complex to a highly conserved CWLC motif in SU that resembles the active-site sequence of thiol-disulfide exchange enzymes. *Journal of virology* **71**, 8073-7(1997).
31. Kraunus, J. et al. Murine leukemia virus regulates alternative splicing through sequences upstream of the 5' splice site. *The Journal of biological chemistry* **281**, 37381-90(2006).
32. Lewis, P.F. & Emerman, M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *Journal of virology* **68**, 510-6(1994).
33. Roe, T. et al. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *The EMBO journal* **12**, 2099-108(1993).

34. Bukrinsky, M.I. et al. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 6580-4(1992).
35. Everts, B. & Poel, H.G. van der Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. *Cancer gene therapy* **12**, 141-61(2005).
36. Schambach, A., Maetzig, T. & Baum, C. Retroviral Vectors for Cell and Gene Therapy. *Gene and Cell Therapy* 3-15(2007).
37. Cone, R.D. & Mulligan, R.C. High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. 1984. *Biotechnology (Reading, Mass.)* **24**, 420-4(1992).
38. Miller, A.D., Trauber, D.R. & Buttimore, C. Factors involved in production of helper virus-free retrovirus vectors. *Somatic cell and molecular genetics* **12**, 175-83(1986).
39. Coroadinha, A.S. et al. The use of recombinase mediated cassette exchange in retroviral vector producer cell lines: predictability and efficiency by transgene exchange. *Journal of biotechnology* **124**, 457-68(2006).
40. Chong, H., Starkey, W. & Vile, R.G. A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs, and endogenous retroviral sequences. *Journal of virology* **72**, 2663-70(1998).
41. Yu, S.F. et al. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 3194-8(1986).
42. Modlich, U. et al. Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* **108**, 2545-53(2006).
43. Emerman, M. & Temin, H.M. Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. *Cell* **39**, 449-67(1984).
44. Emerman, M. & Temin, H.M. Comparison of promoter suppression in avian and murine retrovirus vectors Nucleic Acids Research. *Nucleic Acids Research* **14**, 9381-9396(1986).
45. Jäger, U., Zhao, Y. & Porter, C.D. Endothelial cell-specific transcriptional targeting from a hybrid long terminal repeat retrovirus vector containing human prepro-endothelin-1 promoter sequences. *Journal of virology* **73**, 9702-9(1999).
46. Hildinger, M. et al. Design of 5' Untranslated Sequences in Retroviral Vectors Developed for Medical Use. *J. Virol.* **73**, 4083-4089(1999).
47. Kraunus, J. et al. Self-inactivating retroviral vectors with improved RNA processing. *Gene therapy* **11**, 1568-78(2004).
48. Szymczak, A.L. & Vignali, D.A.A. Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert opinion on biological therapy* **5**, 627-38(2005).

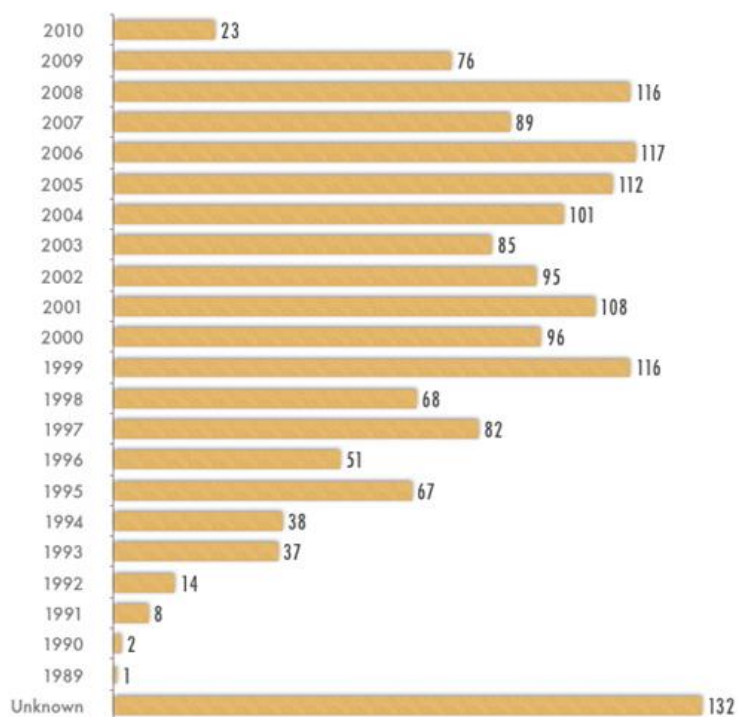
49. Miller, A.D. & Chen, F. Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *Journal of Virology* **70**, 5564-71(1996).
50. Burns, J.C. et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 8033-7(1993).
51. Yee, J.K., Friedmann, T. & Burns, J.C. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods in cell biology* **43 Pt A**, 99-112(1994).
52. Lodge, R. et al. MuLV-based vectors pseudotyped with truncated HIV glycoproteins mediate specific gene transfer in CD4+ peripheral blood lymphocytes. *Gene therapy* **5**, 655-64(1998).
53. Kasahara, N., Dozy, A. & Kan, Y. Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* **266**, 1373-1376(1994).
54. Chu, T.H. et al. Cell targeting with retroviral vector particles containing antibody-envelope fusion proteins. *Gene therapy* **1**, 292-9(1994).
55. Etienne-Julan, M. et al. The efficiency of cell targeting by recombinant retroviruses depends on the nature of the receptor and the composition of the artificial cell-virus linker. *The Journal of general virology* **73 (Pt 12)**, 3251-5(1992).
56. Goud, B., Legrain, P. & Buttin, G. Antibody-mediated binding of a murine ecotropic Moloney retroviral vector to human cells allows internalization but not the establishment of the proviral state. *Virology* **163**, 251-4(1988).
57. Donahue, R.E. et al. Helper Virus Induced T Cell Lymphoma in Nonhuman Primates after Retroviral Mediated Gene Transfer. *The Journal of Experimental Medicine* **176**, 1125-1135(1992).
58. Vanin, E.F. et al. Characterization of replication-competent retroviruses from nonhuman primates with virus-induced T-cell lymphomas and observations regarding the mechanism of oncogenesis. *Journal of virology* **68**, 4241-50(1994).
59. Stuhlmann, H., Dieckmann, M. & Berg, P. Transduction of cellular neo mRNA by retrovirus-mediated recombination. *Journal of virology* **64**, 5783-96(1990).
60. Mann, R. & Baltimore, D. Varying the position of a retrovirus packaging sequence results in the encapsidation of both unspliced and spliced RNAs. *Journal of virology* **54**, 401-7(1985).
61. Linial, M.L. & Miller, A.D. Retroviral RNA packaging: sequence requirements and implications. *Current topics in microbiology and immunology* **157**, 125-52(1990).
62. Cruz, P.E. et al. Production of Retroviral Vectors: From the Producer Cell to the Final Product. *Gene and Cell Therapy* 17-37(2007).
63. Le Doux, J.M. et al. Kinetics of retrovirus production and decay. *Biotechnology and bioengineering* **63**, 654-62(1999).

64. Pizzato, M. et al. Development of a suspension packaging cell line for production of high titre, serum-resistant murine leukemia virus vectors. *Gene therapy* **8**, 737-45(2001).
 65. Wikström, K., Blomberg, P. & Islam, K.B. Clinical grade vector production: analysis of yield, stability, and storage of gmp-produced retroviral vectors for gene therapy. *Biotechnology progress* **20**, 1198-203(2004).
 66. Naviaux, R.K. et al. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *Journal of virology* **70**, 5701-5(1996).
 67. Yap, M.W., Kingsman, S.M. & Kingsman, a J. Effects of stoichiometry of retroviral components on virus production. *The Journal of general virology* **81**, 2195-202(2000).
 68. Miller, a D. et al. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *Journal of virology* **65**, 2220-4(1991).
 69. Morgenstern, J.P. & Land, H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic acids research* **18**, 3587-96(1990).
 70. Danos, O. & Mulligan, R.C. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 6460-4(1988).
 71. Irving, J.M., Chang, L.W.S. & Castillo, F.J. A Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection and Quantitation of Murine Retroviruses. *Bio/Technology* **11**, 1042-1046(1993).
 72. Rigg, R.J. et al. A novel human amphotropic packaging cell line: high titer, complement resistance, and improved safety. *Virology* **218**, 290-5(1996).
 73. Patience, C. et al. Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells. *Journal of virology* **72**, 2671-6(1998).
 74. Finer, M.H. et al. A High-Efficiency Retroviral Transduction System Primary Human T Lymphocytes. *Blood* **83**, 43-50(1994).
 75. Davis, J.L. et al. Retroviral particles produced from a stable human-derived packaging cell line transduce target cells with very high efficiencies. *Human gene therapy* **8**, 1459-67(1997).
 76. Cosset, F.L. et al. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *Journal of virology* **69**, 7430-6(1995).
 77. Pensiero, M.N. et al. Development of amphotropic murine retrovirus vectors resistant to inactivation by human serum. *Human gene therapy* **7**, 1095-101(1996).
 78. Würtele, H., Little, K.C.E. & Chartrand, P. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene therapy* **10**, 1791-9(2003).
 79. Li, Q. et al. Locus control regions. *Blood* **100**, 3077-86(2002).
 80. West, A.G. & Fraser, P. Remote control of gene transcription. *Human Molecular Genetics* **14**, 101-111(2005).
-

-
81. Hampf, M. & Gossen, M. Promoter crosstalk effects on gene expression. *Journal of molecular biology* **365**, 911-20(2007).
 82. Bode, J. et al. Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Critical reviews in eukaryotic gene expression* **10**, 73-90(2000).
 83. Sinn, P.L., Sauter, S.L. & McCray, P.B. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene therapy* **12**, 1089-98(2005).
 84. Li, Z. et al. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science (New York, N. Y.)* **296**, 497(2002).
 85. Baum, C. et al. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* **101**, 2099-2114(2003).
 86. Carrondo, M.J.T. et al. Impact of retroviral vector components stoichiometry on packaging cell lines: effects on productivity and vector quality. *Human gene therapy* **19**, 199-210(2008).
 87. O'Gorman, S., Fox, D.T. & Wahl, G.M. Recombinase-Mediated Gene Activation and Site-Specific Integration in Mammalian Cells. *Science* **251**, 1351 - 1355(1991).
 88. Hoess, R.H., Ziese, M. & Sternberg, N. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 3398-402(1982).
 89. Wirth, D. et al. Road to precision : recombinase-based targeting technologies for genome engineering. *Current Opinion in Biotechnology* (2007).doi:10.1016/j.copbio.2007.07.013
 90. Zigler, J. et al. Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **21**, 282-7(1985).
 91. Andreason, G. & Evans, G. Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *BioTechniques* **6**, 650-660(1988).
 92. McTaggart, S. & Al-Rubeai, M. Effects of culture parameters on the production of retroviral vectors by a human packaging cell line. *Biotechnology progress* **16**, 859-65(2000).
 93. Merten, O.-W. State-of-the-art of the production of retroviral vectors. *The journal of gene medicine* **6 Suppl 1**, S105-24(2004).
 94. Ye, K. et al. Effect of pH on infectivity and morphology of ecotropic moloney murine leukemia virus. *Biotechnology progress* **19**, 538-43(2004).
-

Anexo I

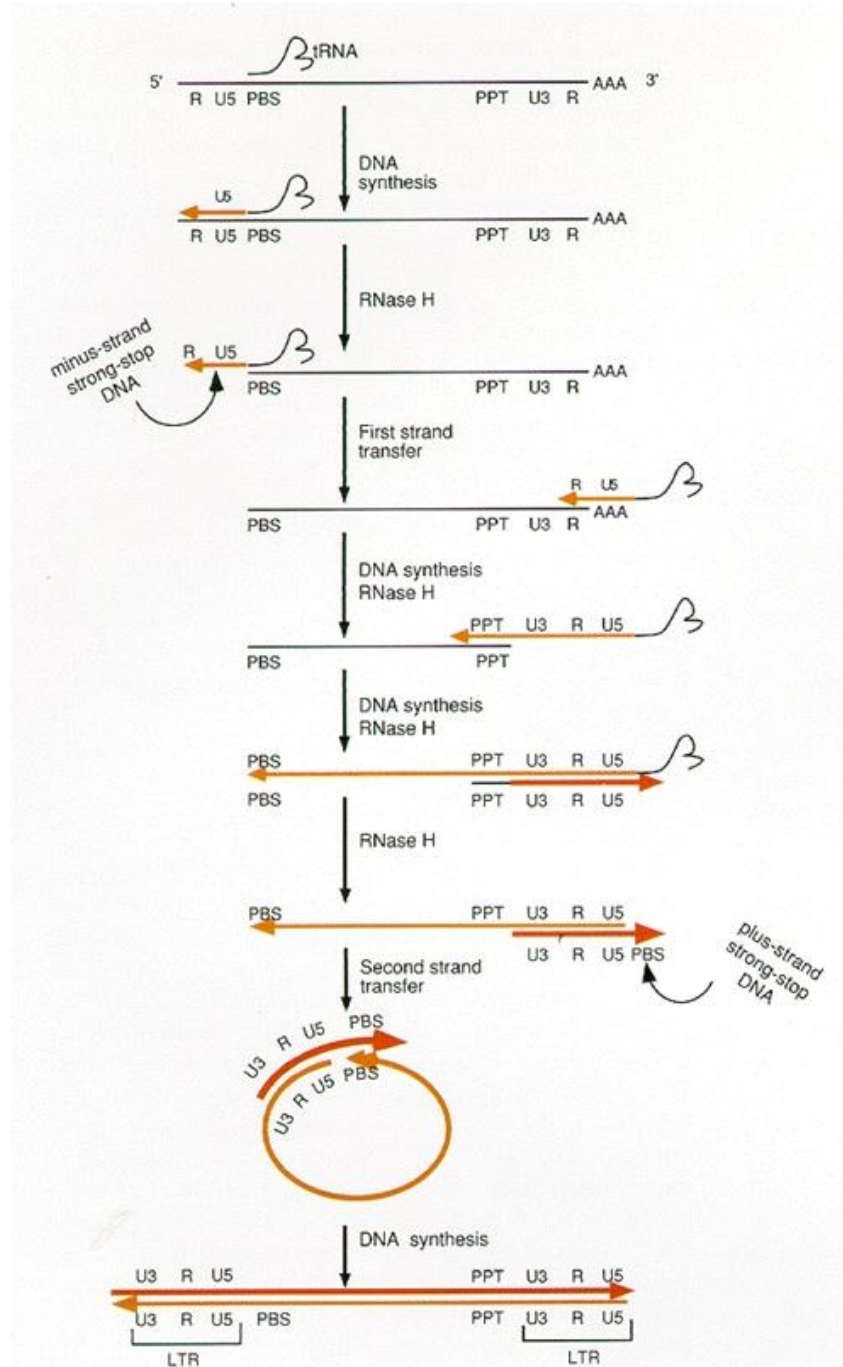
Número de testes clínicos de terapia génica aprovados por todo o mundo entre 1989 e o primeiro semestre de 2010.



Adaptado de <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.

Anexo II

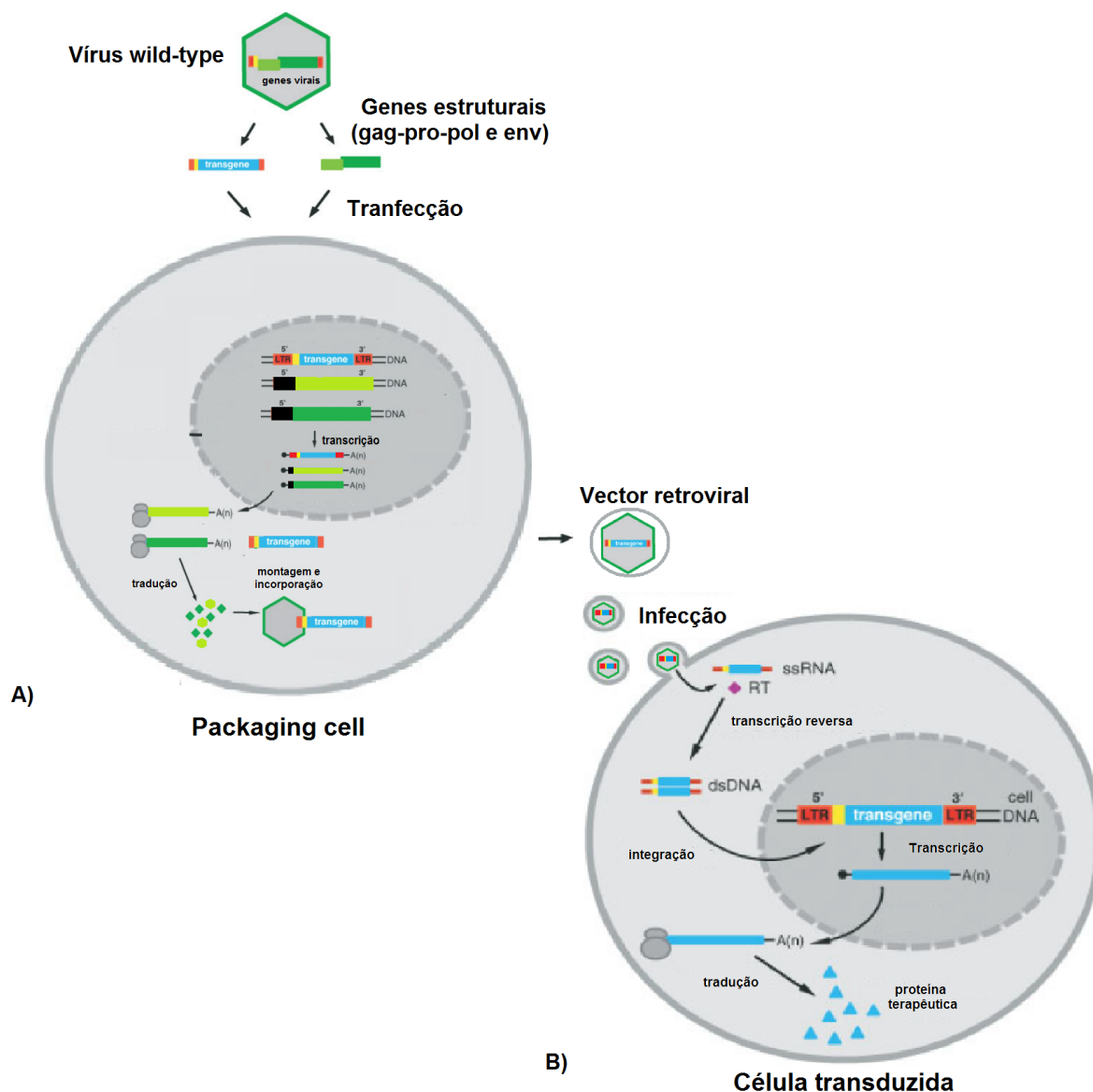
Processo de transcrição reversa do genoma retroviral



Legenda: A linha preta, laranja e vermelha representam respectivamente o RNA viral, a cadeia de DNA de polaridade negativa e a cadeia de DNA de polaridade positiva sintetizadas pela enzima transcriptase reversa ²⁶.

Anexo III

Construção de *packaging cells lines*, produção de vectores retrovirais sem capacidade replicativa e processo de transdução com os vectores retrovirais produzidos.



Adaptado de: Gonçalves, 2005.

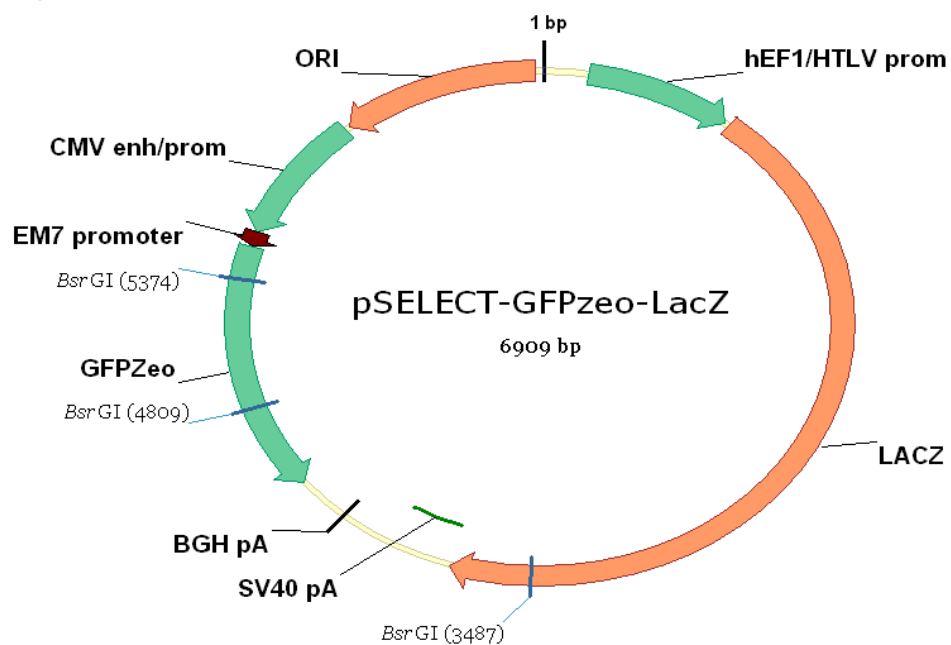
Legenda: Construção de *packaging cells lines*, produção de vectores retrovirais sem capacidade replicativa e processo de transdução com os vectores retrovirais produzidos.

A) As *packaging cells lines* resultam da integração de vectores de expressão com os genes estruturais (*gag-pro-pol*) e *env* (representados a verde) de determinados retrovírus no seu genoma celular, de modo a permitir a sua estável expressão. As sequências LTR (representadas a vermelho) e Ψ (representada a amarelo) também poderão ser introduzidas no vector de expressão com o gene terapêutico. Após a transfecção das *packaging cells* com este último, com a expressão de todos os genes transfectados, irão formar-se vectores retrovirais sem capacidade replicativa.

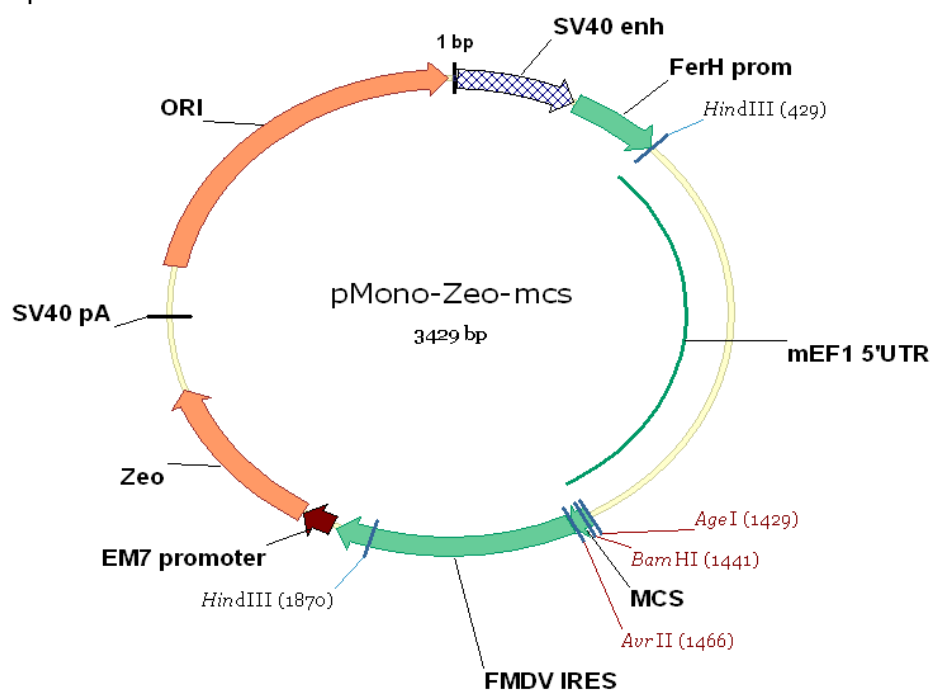
B) Na transdução de células com os vectores produzidos, após o processo de infecção, o gene terapêutico será integrado no genoma celular onde a partir do qual ocorrerá a expressão da proteína terapêutica.

Anexo IV

Plasmídeo pSELECT-GFPzeo-LacZ

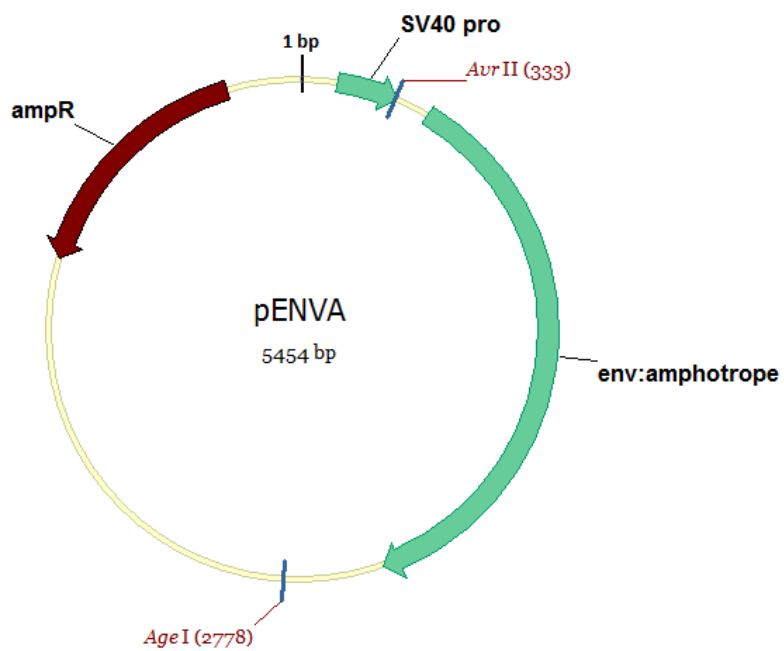


Plasmídeo pMono-Zeo-mcs

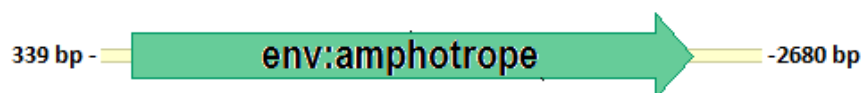


Anexo V

Plasmídeo pENVA

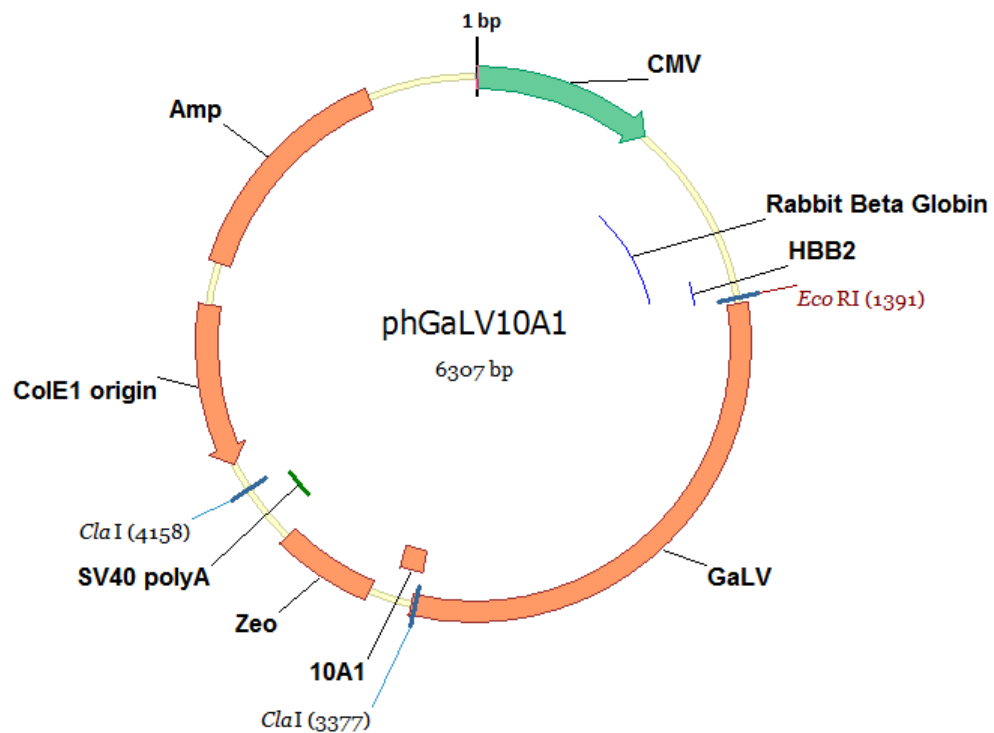


Sequência amplificada do plasmídeo pENVA

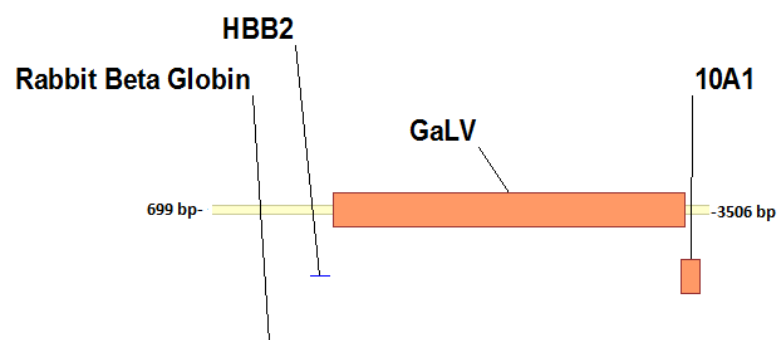


Anexo VI

Plasmídeo phGalV10A1

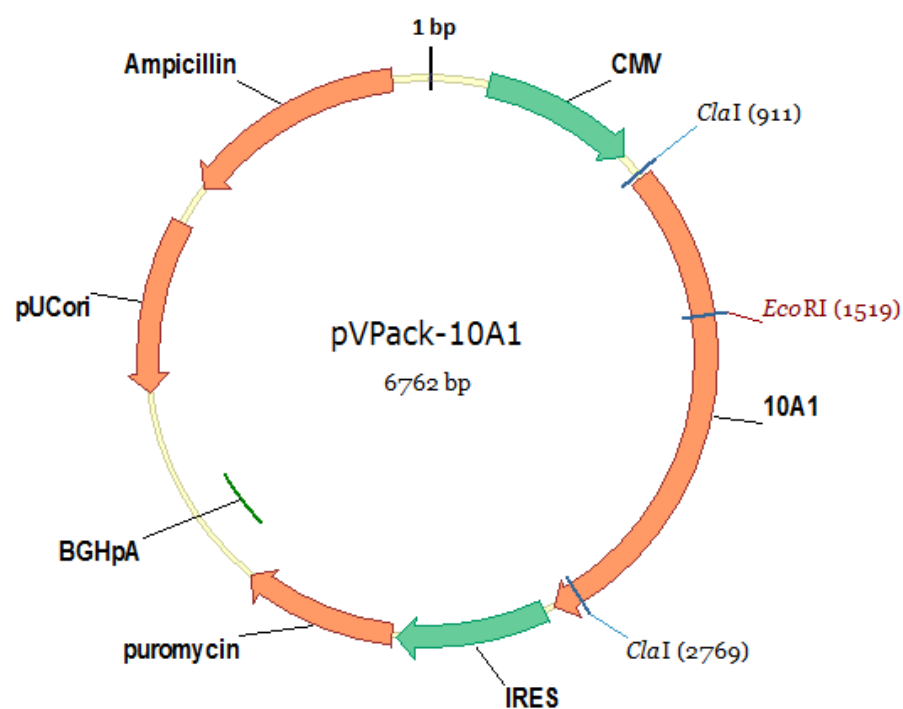


Sequência amplificada do plasmídeo phGalV10A1

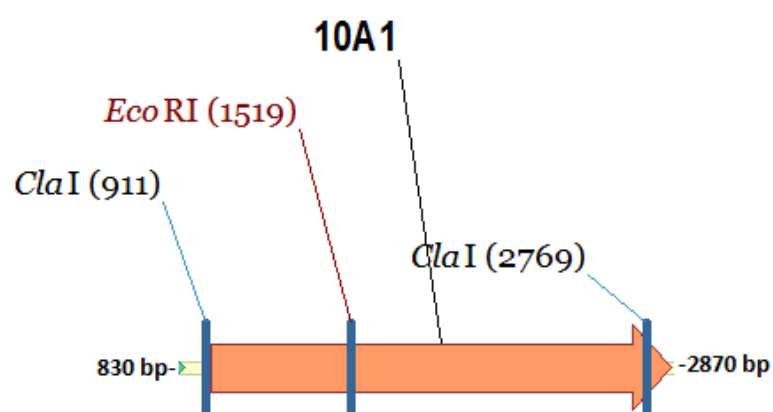


Anexo VII

Plasmídeo pVPack-10A1

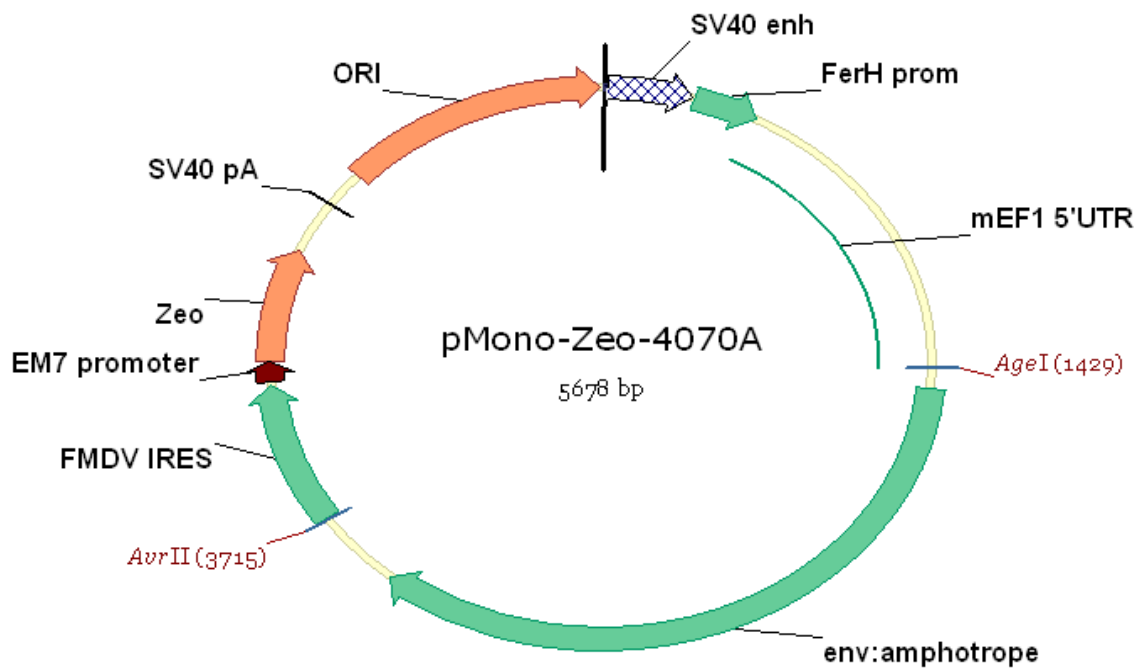


Sequência amplificada do plasmídeo phGalV10A1

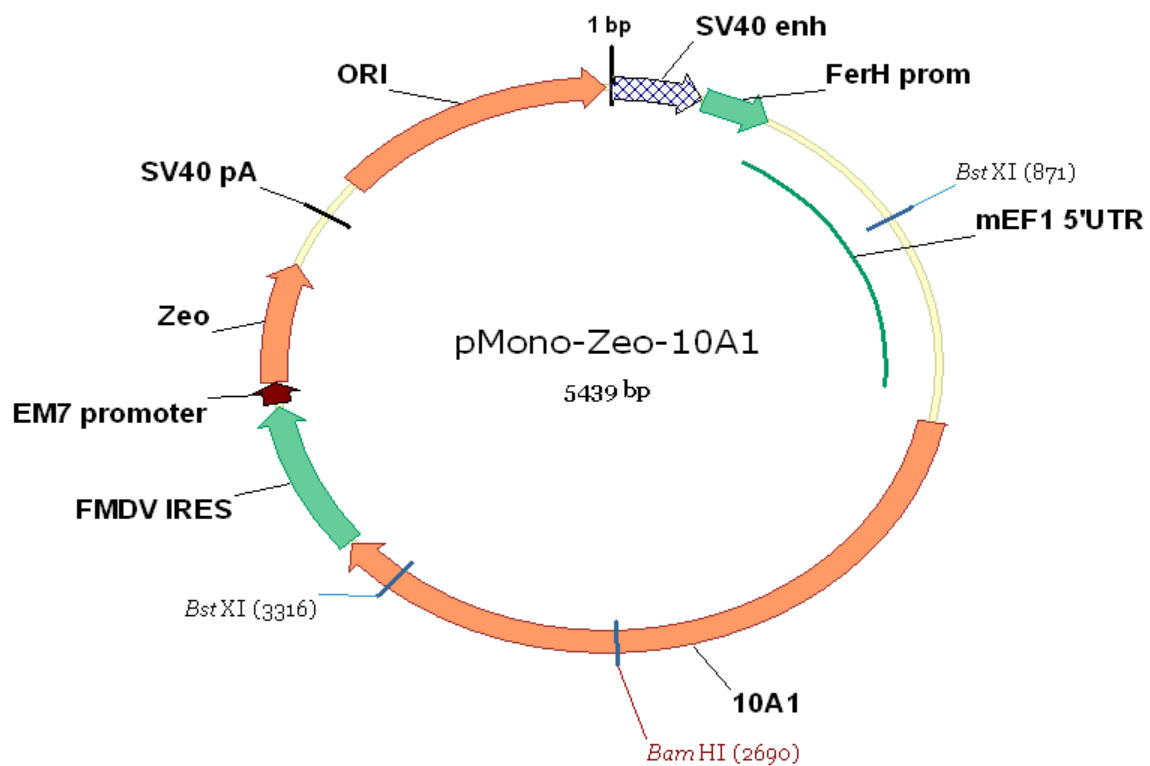


Anexo VIII

Plasmídeo pMono-zeo-4070A

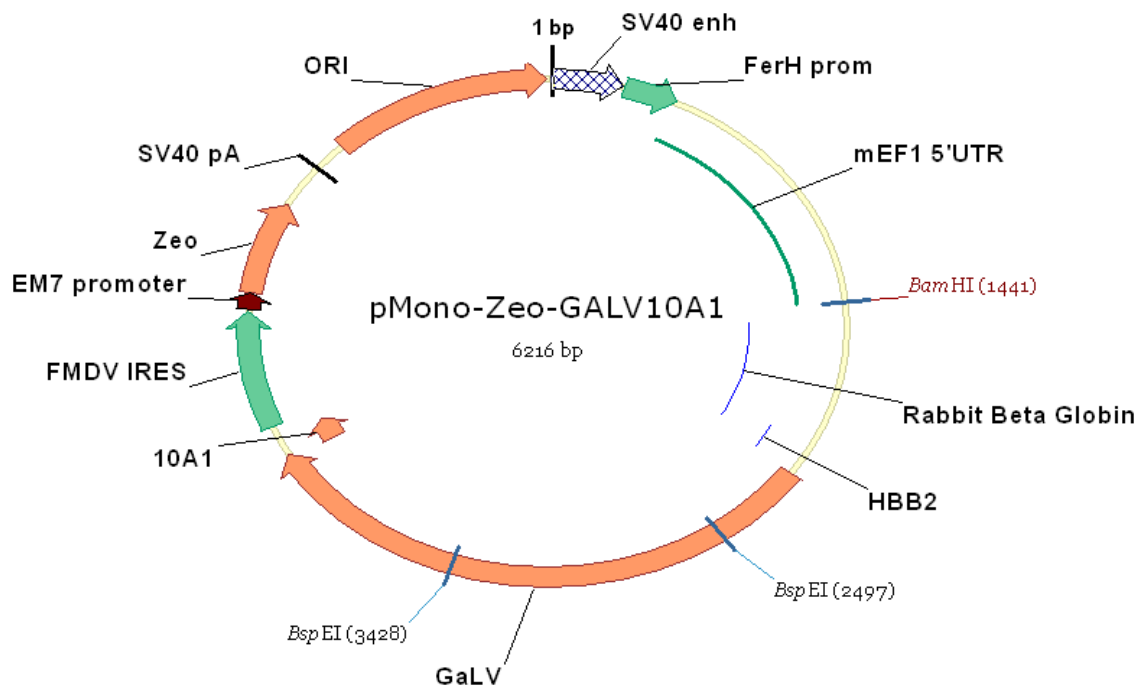


Plasmídeo pMono-zeo-10A1



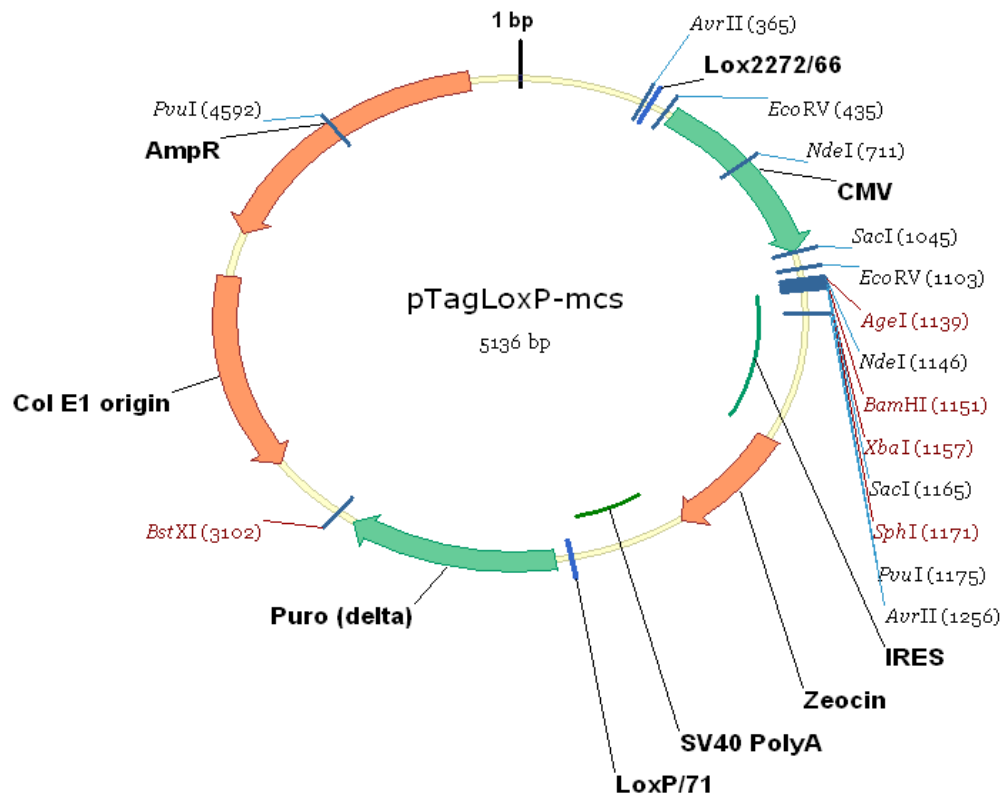
Anexo IX

Plasmídeo pMono-zeo-GalV10A1

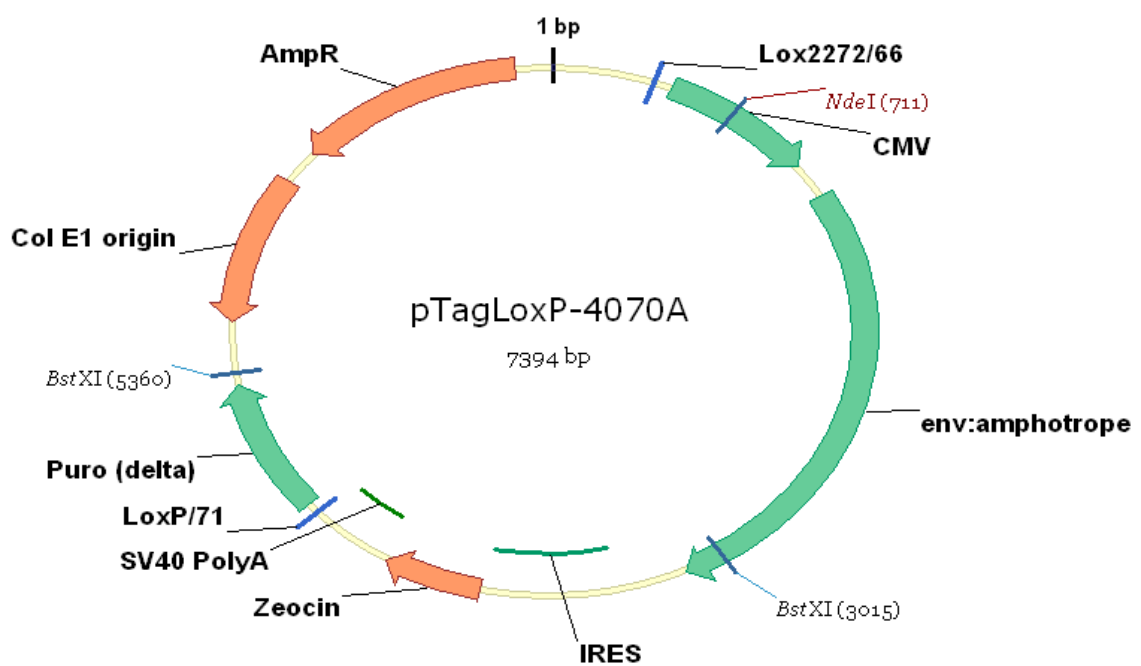


Anexo X

Plasmídeo pTagLoxP-mcs



Plasmídeo pTagLoxP-4070A



Anexo XI

293#3 gp11 4070A

Clone	[Células viáveis] (10 ⁶ células)	Erro (10 ⁶ células)	Viabilidade %	[p.i.] (p.i./ml)	Erro (p.i./ml)	[p.i.] (p.i./10 ⁶ células)	Erro* (p.i./10 ⁶ células)
1	1,29	0,065	84,3%	133,3	115,5	103,4	± 84,3
2	0,84	0,042	90,9%	133,3	115,5	158,2	± 129,1
3	1,22	0,061	88,4%	66,7	115,5	54,6	± 91,9
4	1,15	0,058	92,0%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
5	1,43	0,072	95,3%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
6	1,29	0,065	84,3%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
7	1,21	0,061	91,7%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
8	2,29	0,115	90,9%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
9	1,60	0,080	86,5%	200,0	200,0	125,0	± 118,8
10	1,72	0,086	93,5%	200,0	200,0	116,3	± 110,5
11	1,60	0,080	91,4%	66,7	115,5	41,7	± 70,1
12	0,87	0,043	91,5%	66,7	115,5	76,8	± 129,2
13	1,69	0,085	90,9%	333,3	115,5	197,2	± 58,5
14	1,01	0,051	93,5%	66,7	115,5	66,0	± 111,0
15	0,83	0,042	85,5%	66,7	115,5	80,2	± 134,9
16	0,94	0,047	91,9%	133,3	115,5	142,3	± 116,1
17	1,96	0,098	92,9%	133,3	115,5	68,0	± 55,5
18	1,20	0,060	90,9%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
19	0,87	0,043	89,6%	133,3	115,5	153,4	± 125,2
20	1,47	0,074	94,8%	66,7	115,5	45,4	± 76,3
21	1,45	0,073	85,8%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
22	1,10	0,055	86,6%	66,7	115,5	60,6	± 101,9
23	1,22	0,061	93,8%	400,0	200,0	327,9	± 147,5
24	1,27	0,064	91,4%	133,3	115,5	105,0	± 85,7
25	1,97	0,099	82,4%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
26	1,45	0,073	86,8%	66,7	115,5	46,0	± 77,3
27	1,23	0,062	91,1%	333,3	115,5	271,0	± 80,3
28	1,30	0,065	86,1%	666,7	702,4	512,8	± 514,6
29	1,48	0,074	90,8%	266,7	305,5	180,2	± 197,4
30	1,21	0,061	90,3%	333,3	115,5	275,5	± 81,7
31	2,15	0,108	86,3%	400,0	0,0	186,0	± 9,3
32	1,29	0,065	90,8%	333,3	230,9	258,4	± 166,1
33	0,47	0,024	82,5%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
34	1,07	0,054	86,3%	66,7	115,5	62,3	± 104,8
35	1,45	0,073	92,4%	66,7	115,5	46,0	± 77,3
36	1,10	0,055	92,2%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
37	1,19	0,060	90,2%	66,7	115,5	56,0	± 94,2

*O erro apresentado corresponde ao desvio padrão (n=3).

Anexo XII

293#3 gp22 4070A

Clone	[Células viáveis] 10 ⁶ células	Erro 10 ⁶ células	Viabilidade	[p.i.] (p.i./ml)	Erro (p.i./ml)	[p.i.] (p.i./10 ⁶ células)	Erro* (p.i./10 ⁶ células)
1	1,30	0,065	95,2%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
2	1,57	0,078	85,2%	2533,3	901,8	1618,4	± 495,2
3	1,82	0,091	94,3%	27800,0	6630,2	15266,3	± 2877,7
4	0,85	0,042	89,3%	4800,0	1600,0	5679,1	± 1609,1
5	1,40	0,070	91,6%	25333,3	1154,7	18095,2	± 80,0
6	1,48	0,074	95,3%	3533,3	1418,9	2392,2	± 841,1
7	0,42	0,021	93,1%	3466,7	945,2	8329,3	± 1854,5
8	0,56	0,028	94,5%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
9	1,02	0,051	89,8%	24600,0	692,8	24046,9	± 525,1
10	0,60	0,030	91,9%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
11	0,82	0,041	89,5%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
12	1,50	0,075	90,7%	1866,7	1474,2	1248,6	± 923,7
13	2,04	0,102	93,7%	2200,0	529,2	1077,4	± 205,3
14	0,80	0,040	86,7%	66,7	115,5	83,3	± 140,1
15	1,57	0,078	92,3%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
16	1,33	0,066	80,8%	2533,3	461,9	1909,1	± 252,6
17	1,35	0,068	87,6%	12866,7	1553,5	9516,8	± 673,2
18	1,41	0,070	92,8%	4533,3	1361,4	3224,3	± 807,0
19	1,11	0,055	92,4%	5200,0	871,8	4693,1	± 552,1
20	1,13	0,056	91,0%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
21	1,27	0,063	94,3%	1600,0	692,8	1264,8	± 484,4
22	1,93	0,097	87,4%	12000,0	4529,9	6217,6	± 2036,2
23	1,07	0,053	78,9%	8733,3	2300,7	8184,9	± 1747,0
24	1,45	0,073	95,2%	6000,0	346,4	4132,2	± 32,0
25	1,24	0,062	88,0%	1733,3	1514,4	1393,4	± 1147,7
26	1,03	0,051	87,7%	5266,7	1222,0	5133,2	± 934,4
27	0,75	0,038	81,4%	2533,3	1270,2	3358,5	± 1516,0
28	1,40	0,070	88,2%	5200,0	3026,5	3711,6	± 1974,7
29	1,04	0,052	93,1%	333,3	416,3	321,8	± 385,8
30	2,10	0,105	87,0%	7000,0	529,2	3327,0	± 85,1
31	1,11	0,056	92,7%	2066,7	945,2	1858,5	± 757,0

*O erro apresentado corresponde ao desvio padrão (n=3).

Anexo XIII

293#3 gp11 10A1

Clone	[Células viáveis] (10 ⁶ células)	Erro (10 ⁶ células)	Viabilidade	[p.i.] (p.i./ml)	Erro (p.i./ml)	[p.i.] (p.i./10 ⁶ células)	Erro* (p.i./10 ⁶ células)
1	0,80	0,040	89,1%	33,3	57,7	41,8	± 70,3
2	0,79	0,040	92,8%	33,3	57,7	42,2	± 71,0
3	1,00	0,050	90,1%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
4	0,58	0,029	89,8%	33,3	57,7	57,2	± 96,2
5	1,79	0,090	91,4%	33,3	57,7	18,6	± 31,3
6	0,96	0,048	89,5%	0,0	0,0	0,0	± 0,0

*O erro apresentado corresponde ao desvio padrão (n=3).

293#3 gp22 10A1

Clone	[Células viáveis] (10 ⁶ células)	Erro (10 ⁶ células)	Viabilidade	[p.i.] (p.i./ml)	Erro (p.i./ml)	[p.i.] (p.i./10 ⁶ células)	Erro* (p.i./10 ⁶ células)
1	0,91	0,045	90,9%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
2	0,47	0,023	67,0%	66,7	57,7	142,8	± 116,5
3	0,85	0,042	85,3%	33,3	57,7	39,4	± 66,4
4	0,99	0,049	89,7%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
5	0,79	0,040	81,4%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
6	1,64	0,082	85,4%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
7	1,48	0,074	90,8%	33,3	57,7	22,5	± 37,9
8	1,03	0,052	78,0%	0,0	0,0	0,0	± 0,0
9	1,12	0,056	85,8%	100,0	0,0	89,7	± 4,5
10	1,40	0,070	90,9%	33,3	57,7	23,8	± 40,0
11	1,49	0,075	83,7%	100,0	0,0	67,1	± 3,4
12	1,42	0,071	88,7%	0,0	0,0	0,0	± 0,0

*O erro apresentado corresponde ao desvio padrão (n=3).